

MARIA MADALENA DOS SANTOS ALVES

ESTUDO E CARACTERIZAÇÃO DE DIGESTORES ANAERÓBIOS DE LEITO FIXO



UNIVERSIDADE DO MINHO
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA BIOLÓGICA
1998

MARIA MADALENA DOS SANTOS ALVES

ESTUDO E CARACTERIZAÇÃO DE DIGESTORES ANAERÓBIOS DE LEITO FIXO

Dissertação para Doutoramento em Engenharia Biológica e Química
na Universidade do Minho



UNIVERSIDADE DO MINHO
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA BIOLÓGICA
1998

*Provas de Doutoramento realizadas
em 23 de Julho de 1998*

Constituição do Juri

Presidente: Doutor Carlos António Alves Bernardo, Professor Catedrático da
Universidade do Minho

Vogais

Doutor Juan Lema Rodicio, Professor Catedrático da Universidade de Santiago
de Compostela

Doutor Rui Alfredo da Rocha Boaventura, Investigador Principal da Faculdade de
Engenharia da Universidade do Porto

Doutora Maria Odete Lopes da Silva Maia, Professora Associada da Universidade
do Minho

Doutor Luís Manuel Ferreira de Melo, Professor Catedrático da Universidade do
Minho

Doutor Manuel José Magalhães Gomes Mota, Professor Catedrático da
Universidade do Minho

Doutor Júlio Maggiolly Novais, Professor Catedrático do Instituto Superior
Técnico da Universidade Técnica de Lisboa

Tese realizada sob orientação de:

Doutor Júlio Maggiolly Novais
Professor Catedrático

Doutor Manuel José Magalhães Gomes Mota
Professor Catedrático

UNIVERSIDADE DO MINHO
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA BIOLÓGICA
1998

*"Nada é mais abundante do que a
inesgotável riqueza da natureza. Ela
mostra-nos apenas superfícies, mas tem
um milhão de braços de profundidade"*
RALPH WALDO EMERSON

ao Eugénio e ao David
aos meus pais: David e Ester

Preâmbulo

Quando ingressei na então Secção de Engenharia Biológica da Área de Ciências de Engenharia da Universidade do Minho, em Outubro de 1988, manifestei interesse em que o trabalho de investigação que iria realizar se desenvolvesse na área ambiental. De facto, o interesse por questões ambientais tinha sido anteriormente despertado ainda na licenciatura em Engenharia Química na Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, onde, após escolha da opção de Poluição, colaborei em diversos trabalhos do Grupo de Estudos de Poluição, e também posteriormente na Comissão de Coordenação da Região Norte, como membro da equipa do Projecto de Gestão Integrado dos Recursos Hídricos do Norte (PGIRH/N). O início da investigação em digestão anaeróbia na “Engenharia Biológica” foi possível pelo empenho com que Professor Luis de Melo e a Professora Maria Odete Maia então se dedicaram à captação de financiamento. Lembro ainda o apoio que o Professor Júlio Maggiolly Novais nos concedeu nessa altura, nomeadamente com a co-orientação do meu trabalho de mestrado, em 1992.

No decorrer deste trabalho, senti-me acompanhada por muitas pessoas a quem desejo expressar os meus sinceros agradecimentos.

Refiro em primeiro lugar os meus orientadores Professor Júlio Maggiolly Novais e Professor Manuel Mota, que sempre me apoiaram e aconselharam e a quem devo um especial agradecimento pelas óptimas condições de trabalho que me proporcionaram, pelos muitos ensinamentos e pela (excessiva !) confiança demonstrada desde sempre.

Ao Director do Departamento de Engenharia Biológica, Professor Manuel Mota e à Professora Maria Odete Maia, directora do Laboratório de Investigação II onde decorreu a parte experimental deste trabalho, agradeço o incentivo e apoio constantes.

I would like to express a special thank to Professor Emer Collieran for learning me all the details of the pressure transducer technique and for the friendship, and the very pleasant stay she proportioned me in Galway. Her valuable views and comments on some papers described in this work are gratefully acknowledged. I should also thank all the people who helped me in that stay namely Frederic Thalasso, Siobhain Finnegan, Janet Mensink, Mike Coughlan and Vince O' Flaherty.

Ao colega Eugénio Ferreira agradeço a grande ajuda na informática, na espectrometria de massa e análise de imagem e todos os conselhos, incentivos e infinito apoio durante a realização do trabalho.

Lembro ainda o Mohamed Bellouti, com quem compartilhei muitas e intermináveis discussões sobre anaerobiose e outros assuntos.

A todos os colegas que me acompanharam no laboratório, nomeadamente à Filomena, à Cristina, à Raquel ao Tó e especialmente à Cinoca, agradeço a partilha dos entusiasmos e dos desalentos. Refiro ainda a importante colaboração do Luis Amaral no trabalho de análise de imagem e não esqueço a contribuição da Ilia Ramos, do Rui Vilaverde, da Luisa Pinto e Silva, da Olga Torres, da Magda Lacerda, do Nuno Cruz e da Maria João Martins.

Não posso deixar de referir o trabalho do “nosso” técnico Manuel Santos que, como sempre, se revelou indispensável. Agradeço-lhe todo o apoio na resolução dos problemas e é-me difícil imaginar ter feito este trabalho sem a sua ajuda.

A todos os colegas e funcionários do DEB agradeço a camaradagem e as palavras de encorajamento.

Ao meu marido Eugénio agradeço o incentivo e apoio incondicionais e ao nosso bebé David os sorrisos, a meiguice e a energia que me tem transmitido e que foi, em parte, dirigida para este trabalho.

Aos meus pais, David e Ester a quem devo tudo, agradeço todo o incentivo e compreensão e especialmente o apoio desmedido que me proporcionaram durante parte da escrita desta tese. Aos meus irmãos, cunhadas, sobrinhos e amigos, um reconhecimento pela amizade e companheirismo.

Sumário

Este trabalho centrou-se no estudo de digestores anaeróbios de leito fixo. Num primeiro estudo, compararam-se duas configurações de digestores, uma segmentada em três andares e uma configuração convencional de modo ascendente. Inicialmente avaliou-se o efeito de aumentar a concentração de substrato entre 3 e 12 g CQO/L no desempenho, nos perfis de degradação de substrato, nas características físicas e biológicas da biomassa desenvolvida e nas características hidrodinâmicas das duas configurações. O tempo de retenção hidráulico foi mantido em 2 dias. Em termos de desempenho não houve diferenças significativas. A remoção de CQO era superior a 97% em ambas as configurações. As diferenças de escoamento entre as duas configurações foram mais acentuadas para baixas concentrações de substrato. Com o aumento da concentração de substrato a população microbiana ficou segregada ao longo da altura dos digestores, com a actividade acidogénica mais concentrada na base, a actividade sintrófica no meio e a actividade acetoclástica e hidrogenofílica no topo. Os agregados não apresentavam características muito diferenciadas nas várias secções dos digestores, embora o seu tamanho e a sua velocidade de sedimentação tenham aumentado com o aumento da concentração de substrato, especialmente nas secções do topo. A introdução de alimentações laterais no digestor segmentado, diminuindo o tempo de retenção hidráulico entre 2 dias e 10 horas, não provou melhorar o funcionamento desta configuração relativamente ao digestor convencional. A actividade acidogénica máxima passou a estar localizada na secção do meio do digestor segmentado, que era o andar que recebia a maior parte da carga orgânica que foi aplicada ao sistema. O volume “morto” dos digestores atingiu 60%. Os agregados acumulados no topo dos digestores variaram acentuadamente as suas propriedades biológicas e físicas ao longo da operação, tendo passado por máximos acentuados de actividade acetoclástica, tamanho, velocidade de sedimentação e dimensão fractal.

Devido a alguns problemas de amostragem da biomassa em filtros anaeróbios, foi desenvolvida e é apresentada uma metodologia que permite estudar interacções entre a biomassa e o suporte em filtros anaeróbios de fluxo ascendente. O conceito baseia-se na colocação de vários mini-biorreactores em paralelo na secção central do digestor com possibilidade de serem retirados simultânea ou periodicamente, de acordo com os objectivos do estudo. São apresentadas duas aplicações. Numa primeira experiência compara-se a capacidade de retenção de biomassa de anéis de Raschig de três materiais (Vidro, vidro acrílico e policloreto de vinil (PVC)) com três tamanhos e numa segunda experiência determina-se evolutivamente a distribuição da biomassa no suporte e a actividade de diferentes grupos tróficos.

A metodologia anterior é utilizada para estudar comparativamente o desenvolvimento da biomassa em digestores de leito fixo alimentados com diferentes teores de lípidos. Apesar de não se terem detectado diferenças em termos de actividade metanogénica acetoclástica e hidrogenofílica, verificou-se que a actividade metanogénica em butirato foi estimulada no reactor alimentado com lípidos. Por outro lado, a exposição a lípidos desfavoreceu a adesão da biomassa ao suporte e a resistência das bactérias acetoclásticas a um ácido gordo de cadeia longa (oleato de sódio). No entanto, quando se passou a alimentar directamente este ácido gordo de cadeia longa, mais de 50% do biofilme formado na ausência de lípidos foi removido do suporte e o biofilme formado na presença de lípidos aumentou com a presença de oleato. Por outro lado, a biomassa que tinha estado em contacto com os lípidos tornou-se mais resistente à toxicidade do oleato do que a biomassa que não tinha contactado com lípidos. Após alimentação de oleato como única fonte de carbono, verificou-se que a biomassa foi encapsulada por oleato, tendo-se concluído que a taxa de degradação a metano do oleato adsorvido (105 mg CQO-CH₄/gSV.dia) era superior à taxa de degradação obtida com biomassa adaptada, mas não encapsulada (86 mg CQO-CH₄/gSV.dia) e que esta era superior à taxa de degradação com biomassa não adaptada (18 mg CQO-CH₄/g SV.dia).

Abstract

The aim of this work was the study of anaerobic fixed bed digesters. In a first study a staged configuration was compared with a conventional non-staged upflow fixed bed digester. Initially the effect of increasing substrate concentration from 3 to 12 g COD/L was evaluated in terms of performance, COD and VFA profiles along the height, physical and biological characteristics of biomass and hydrodynamic behaviour of both configurations. Hydraulic retention time was kept in 2 days. No differences were detected in terms of overall performance and during all the trial period more than 97% of influent COD were removed in both digesters. Differences in the fluid flow pattern were more evident for the lowest influent COD. With the increase in influent COD, microbial population became stratified. Higher acidogenic activity was detected at the bottom and hydrogenophilic and acetoclastic activities were maximal at the top. The syntrophic activity in propionate was maximal at the middle sections of both configurations. In terms of their physical properties such as size, settling rate and fractal dimension, microbial aggregates were not differentiated along the height in both configuration, but after increasing the substrate concentration, microbial aggregates increased in size and in settling properties. This change was more evident in the top sections. The introduction of lateral feedings in the staged configuration, decreasing the hydraulic retention time from 2 days to 10 hours, did not enhance the overall performance of this configuration in comparison with the conventional upflow anaerobic filter. The acidogenic activity became maximal at the middle section, where most of the applied organic loading rate was introduced. The “dead volume” achieved 60% of the total volume in both digesters and the microbial aggregates present at the top of both configurations changed markedly their properties. Maximum values of acetoclastic activity, size, settling rate and fractal dimension were detected at the top, during this trial period.

Due to some problems in biomass sampling in anaerobic filters, a new anaerobic, random-packed, fixed-bed reactor, where the fixed bed matrix is distributed between up to 36 independent mini-bioreactors, has been developed to investigate biomass-support interactions in anaerobic filters. In a first experiment the biomass retention capacity of three materials (Glass, Plexiglas and polyvinyl chloride (PVC)) of three sizes was compared after a trial period of 115 days. All materials gave similar results, though entrapped biomass was maximal at 3 g/L of matrix void volume for the smallest size and a maximum of 1 g adhered biomass per m² was obtained for the largest size. Glass, the most smooth and hydrophilic surface, accumulated a thinner biofilm essentially composed of *Methanospirillum*-like bacteria. In a second run, by periodically removing 3 mini-bioreactors, potential specific methanogenic activities against individual substrates were determined along the time and a continuous growth of the adhered biomass was observed, achieving a maximum of 40% of the total biomass.

This methodology was used to study the biomass development in anaerobic filters, fed with different lipid contents. The contact with lipids decreased the adhesion of biomass and the resistance of acetoclastic bacteria to sodium oleate toxicity. Although no effect of lipids was detected on acetoclastic and hydrogenophilic activities, a clear enhancement of methanogenic activity against butyrate was measured. When oleic acid was fed, more than 50% of the biofilm formed in the absence of lipids was removed from the support, whereas the biofilm that had been formed in contact with lipids, increased in the presence of oleate. Furthermore, the biomass that had been in contact with lipids became more resistant to oleic acid toxicity than the biomass developed in the absence of lipids. When oleate was the sole carbon source fed to both digesters, the biomass became encapsulated by adsorbed oleate. The adsorbed oleate degradation rates (105.4 mg COD-CH₄/gVS.day, was higher than the maximum oleate degradation rate developed by acclimatised, but not encapsulated sludge (86 mg COD-CH₄/gVS.day) and this was higher than the oleate degradation rate obtained with non - acclimatised sludge (18 mg COD-CH₄/gVS.day).

Índice

PREÂMBULO	1
SUMÁRIO.....	3
ABSTRACT.....	4
ÍNDICE	5
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE FIGURAS.....	14
LISTA DE SÍMBOLOS	22
1. INTRODUÇÃO	25
1.1 ENQUADRAMENTO.....	27
<i>1.1.1 Novas perspectivas no tratamento de efluentes.....</i>	<i>27</i>
<i>1.1.2 A investigação em digestão anaeróbia.....</i>	<i>29</i>
<i>1.1.3 Aplicação prática da tecnologia de digestão anaeróbia.....</i>	<i>33</i>
1.2 OBJECTIVOS DESTE TRABALHO	39
1.3 ESTRUTURA E ORGANIZAÇÃO DA TESE	40
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	41
2.1 O PROCESSO DE DEGRADAÇÃO ANAERÓBIA.....	43
<i>2.1.1 Microbiologia e bioquímica: evolução numa perspectiva histórica.....</i>	<i>43</i>
<i>2.1.2 Microbiologia e bioquímica: etapas do processo</i>	<i>45</i>
2.1.2.1 Hidrólise	46
2.1.2.2 Fermentação.....	47
2.1.2.3 Acetogénese	48
2.1.2.4 Metanogénese	52
2.1.2.5 Outras transformações.....	54
2.1.2.6 O papel dos protozoários	56
<i>2.1.3 Necessidades nutricionais das bactérias metanogénicas</i>	<i>56</i>

2.1.3.1	Macronutrientes.....	57
2.1.3.2	Micronutrientes.....	58
2.1.4	<i>Condições ambientais</i>	60
2.1.4.1	pH e alcalinidade	60
2.1.4.2	Temperatura.....	62
2.1.4.3	Inibidores da metanogénese.....	64
2.2	APLICAÇÕES TECNOLÓGICAS DO PROCESSO DE DIGESTÃO ANAERÓBIA AO TRATAMENTO DE EFLUENTES LÍQUIDOS	66
2.2.1	<i>UASB</i>	67
2.2.2	<i>Digestor anaeróbio de leito expandido ou fluidizado</i>	70
2.2.3	<i>Processo de contacto</i>	71
2.3	PROCESSOS DE LEITO FIXO	71
2.3.1	<i>Descrição</i>	71
2.3.2	<i>Influência do tipo de suporte</i>	73
2.3.3	<i>Estratégias de inoculação e início de operação</i>	76
2.3.4	<i>Modelos de escoamento em filtros anaeróbios</i>	78
2.3.5	<i>Estudos laboratoriais de aplicação de filtros anaeróbios</i>	79
2.3.6	<i>Aplicações industriais de filtros anaeróbios</i>	79
2.4	METODOLOGIAS DE ESTUDO E CARACTERIZAÇÃO DE DIGESTORES ANAERÓBIOS	82
2.4.1	<i>Caracterização da fase sólida</i>	82
2.4.1.1	Actividade do consórcio microbiano.....	82
2.4.1.2	Caracterização física de agregados microbianos	88
2.4.2	<i>Caracterização das fases líquida e gasosa</i>	90
2.4.2.1	Técnicas tradicionais de monitorização.....	90
2.4.2.2	Potencialidades da utilização da espectrometria de massa.....	92
2.4.2.3	Determinação das características hidrodinâmicas	92
3	COMPARAÇÃO DE UM FILTRO ANAERÓBIO SEGMENTADO COM UMA CONFIGURAÇÃO TRADICIONAL	99
3.1	INTRODUÇÃO	101
3.2	OBJECTIVOS	106
3.3	MATERIAIS E MÉTODOS	107
3.3.1	<i>Instalação experimental</i>	107
3.3.2	<i>Substrato e inóculo</i>	108
3.3.3	<i>Controlo analítico de rotina</i>	109
3.3.3.1	Carência química de oxigénio (CQO)	110
3.3.3.2	Ácidos Gordos Voláteis (AGV)	110

3.3.3.3	Sólidos voláteis (SV)	111
3.3.3.4	Percentagem de metano no biogás	112
3.3.3.5	Azoto total e amoniacal	112
3.3.4	Caracterização da biomassa	113
3.3.4.1	Recolha, separação e quantificação das fracções de biomassa.....	113
3.3.4.2	Testes de actividade metanogénica	114
3.3.4.3	Testes de actividade acidogénica	119
3.3.4.4	Observações microscópicas	120
3.3.4.5	Caracterização física dos agregados	120
3.3.5	Distribuição de Tempos de Residência (DTR)	121
3.3.6	Modo de operação	122
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	124
3.4.1	Operação sem adição de nutrientes	124
3.4.2	Comparação das taxas de degradação com e sem nutrientes	130
3.4.3	Efeito da concentração de substrato no desempenho, selecção microbiana e características hidrodinâmicas das duas configurações	133
3.4.3.1	Resultados de exploração e desempenho	133
3.4.3.2	Comportamento de cada andar de FAII.....	137
3.4.3.3	Perfis de substrato e ácidos voláteis	142
3.4.3.4	Caracterização biológica da biomassa - actividade metanogénica e observações microscópicas	152
3.4.3.5	Caracterização física dos agregados - tamanho, velocidade de sedimentação e rugosidade.....	162
3.4.3.6	Características hidrodinâmicas.....	168
3.4.4	Efeito do tempo de retenção hidráulico e da distribuição da alimentação no digestor segmentado. Desempenho, selecção microbiana e características hidrodinâmicas das duas configurações	175
3.4.4.1	Justificação da opção de multialimentar lateralmente o filtro anaeróbio segmentado.....	175
3.4.4.2	Resultados de exploração do filtro segmentado com alimentações laterais. Comparação com a configuração tradicional.	179
3.4.4.3	Comportamento de cada andar de FAII.....	186
3.4.4.4	Variação do pH e da razão CQO/N.....	193
3.4.4.5	Caracterização biológica da biomassa - actividades metanogénicas.....	195
3.4.4.6	Caracterização física dos agregados - tamanho, velocidade de sedimentação e rugosidade.....	201
3.4.4.7	Características hidrodinâmicas.....	205
3.4.5	Operação de FAI e FAII com TRH de 10 horas. Alimentação única em FAII e distribuída em FAI	208
3.4.6	Caracterização da biomassa no final da operação	212
3.4.6.1	Distribuição da biomassa no suporte	212

3.4.6.2	Caracterização biológica e física da biomassa	214
3.4.7	<i>Variação das características biológicas e físicas da biomassa com o tempo de operação e com as condições operatórias.....</i>	<i>219</i>
3.5	CONCLUSÕES	228
4	INTERACÇÕES ENTRE A BIOMASSA E O SUPORTE EM FILTROS ANAERÓBIOS	233
4.1	INTRODUÇÃO	235
4.2	OBJECTIVOS	238
4.3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	239
4.3.1	<i>Instalação experimental</i>	<i>239</i>
4.3.1.1	Suportes e configuração da matriz na experiência I.....	240
4.3.1.2	Suportes e configuração da matriz na experiência II.....	242
4.3.2	<i>Procedimento utilizado na abertura do biorreactor.....</i>	<i>242</i>
4.3.3	<i>Substrato e Inóculo.....</i>	<i>243</i>
4.3.4	<i>Controlo analítico de rotina.....</i>	<i>244</i>
4.3.5	<i>Caracterização da biomassa.....</i>	<i>244</i>
4.3.5.1	Recolha, separação e quantificação das fracções de biomassa.....	244
4.3.5.2	Testes de actividade metanogénica	245
4.3.5.3	Observações microscópicas.....	245
4.3.6	<i>Condições operatórias.....</i>	<i>245</i>
4.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	246
4.4.1	<i>Caracterização da biomassa na experiência I.....</i>	<i>248</i>
4.4.1.1	Distribuição da biomassa no suporte na experiência I	248
4.4.1.2	Microscopia electrónica.....	251
4.4.2	<i>Caracterização da biomassa na experiência II.....</i>	<i>252</i>
4.4.2.1	Distribuição da biomassa no suporte durante a experiência II	252
4.4.2.2	Evolução da actividade metanogénica de diferentes grupos tróficos	254
4.5	CONCLUSÕES	258
5	EFEITO DOS LÍPIDOS E DO ÁCIDO OLEICO NO DESENVOLVIMENTO DA BIOMASSA EM DIGESTORES ANAERÓBIOS DE LEITO FIXO.....	261
5.1	INTRODUÇÃO	263
5.2	OBJECTIVOS	270
5.3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	271
5.3.1	<i>Instalação experimental</i>	<i>271</i>
5.3.2	<i>Substrato e inóculo.....</i>	<i>271</i>
5.3.3	<i>Controlo analítico de rotina.....</i>	<i>272</i>
5.3.4	<i>Caracterização da biomassa.....</i>	<i>272</i>

5.3.4.1	Recolha, separação e quantificação das fracções de biomassa.....	272
5.3.4.2	Testes de actividade metanogénica	272
5.3.4.3	Testes de toxicidade metanogénica.....	272
5.3.4.4	Testes de biodegradabilidade do oleato de sódio.....	274
5.3.5	<i>Modo de operação.....</i>	276
5.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	278
5.4.1	<i>Operação e desempenho dos digestores.....</i>	278
5.4.2	<i>Distribuição e crescimento da biomassa no suporte.....</i>	285
5.4.3	<i>Evolução da actividade metanogénica de diferentes grupos tróficos do consórcio</i>	291
5.4.4	<i>Evolução da toxicidade do ácido oleico sobre as bactérias metanogénicas acetodásticas.....</i>	296
5.4.5	<i>Capacidade de biodegradação do oleato.....</i>	308
5.5	CONCLUSÕES.....	313
6.	CONCLUSÕES GERAIS	315
7.	SÍNTESE E PERSPECTIVAS DE TRABALHO	323
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	327
	APÊNDICES	355
	APÊNDICE A: EFICIÊNCIA DE SEPARAÇÃO DO BIOGÁS EM CADA ANDAR DO DIGESTOR SEGMENTADO	A.1
	APÊNDICE B: TENTATIVA DE UTILIZAÇÃO DE UM ESPECTRÓMETRO DE MASSA PARA MEDIR A COMPOSIÇÃO DO BIOGÁS	A.5
	APÊNDICE C: CALIBRAÇÃO DO TRANSDUTOR DE PRESSÃO	A.11
	APÊNDICE D: MODELOS DE ESCOAMENTO: DEDUÇÃO DAS EQUAÇÕES E DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS	A.13

Lista de Tabelas

<i>Tabela 1.1 Implantação da digestão anaeróbia nalguns países em desenvolvimento. Os dados excluem tratamento de resíduos sólidos orgânicos e pequenas unidades comunitárias. Adaptado de HULSHOFF POL et al.(1997).</i>	35
<i>Tabela 1.2 Implantação da digestão anaeróbia nalguns países industrializados. Os dados excluem tratamento de resíduos sólidos orgânicos e pequenas unidades comunitárias (HULSHOFF POL et al.1997).</i>	37
<i>Tabela 1.3 Aplicações industriais da digestão anaeróbia na Europa^(*)</i>	38
<i>Tabela 2.1 Exemplo de algumas transformações acetogénicas (DOLFING, 1988).</i>	49
<i>Tabela 2.2 Exemplo de algumas transformações homoacetogénicas (LI et al., 1994).</i>	54
<i>Tabela 2.3 Composição elemental média de bactérias metanogénicas (SCHERER et al., 1983, TAKASHIMA E SPEECE, 1990)</i>	59
<i>Tabela 2.4 Estratégias de inoculação de filtros anaeróbios.</i>	77
<i>Tabela 2.5 Exemplos de aplicação do filtro anaeróbio de fluxo ascendente à escala laboratorial e piloto</i>	80
<i>Tabela 2.6. Exemplos de aplicação do filtro anaeróbio de fluxo ascendente à escala industrial.</i>	81
<i>Tabela 2.7 Teores de F_{420} em diversas espécies de bactérias metanogénicas (REYNOLDS, 1986, DOLFING E MULDER, 1985).</i>	85
<i>Tabela 2.8 Actividades metanogénicas específicas de alguns grupos metabólicos de bactérias envolvidas em ecossistemas metanogénicos (adaptado de DOLFING E BLOEMEN, 1985).</i>	87
<i>Tabela 2.9 Classificação do tipo de escoamento de acordo com o número de dispersão (LEVENSPIEL, 1972).</i>	95
<i>Tabela 2.10 Exemplo de alguns traçadores utilizados em digestores anaeróbios.</i>	97
<i>Tabela 3.1 Curvas de calibração e limites de detecção na análise dos ácidos voláteis por HPLC.</i>	111
<i>Tabela 3.2 Esquema do modo de operação dos digestores.</i>	122
<i>Tabela 3.3 Dados operatórios e resultados de exploração de FAI até ao dia 343 (\pm intervalo com 95% de confiança). Operação sem adição de nutrientes.</i>	126
<i>Tabela 3.4 Dados operatórios e resultados de exploração de FAII até ao dia 343 (\pm intervalo com 95% de confiança). Operação sem adição de nutrientes.</i>	126
<i>Tabela 3.5 Dados operatórios e resultados de exploração do 1º andar de FAII até ao dia 343 (\pm intervalo com 95% de confiança). Operação sem adição de nutrientes.</i>	129
<i>Tabela 3.6 Dados operatórios e resultados de exploração do 2º andar de FAII até ao dia 343 (\pm intervalo com 95% de confiança). Operação sem adição de nutrientes.</i>	129
<i>Tabela 3.7 Dados operatórios e resultados de exploração do 3º andar de FAII até ao dia 343. Operação sem adição de nutrientes.</i>	129

<i>Tabela 3.8 Comparação do desempenho de FAI e FAII com e sem adição de macro e micronutrientes.</i>	131
<i>Tabela 3.9 Dados operatórios e resultados de exploração de FAI com tempo de retenção de 2 dias e concentração de substrato crescente entre 3 e 12 g CQO/L (\pm intervalo com 95% de confiança).</i>	135
<i>Tabela 3.10 Dados operatórios e resultados de exploração de FAII com tempo de retenção de 2 dias e concentração de substrato crescente entre 3 e 12 g CQO/L (\pm intervalo com 95% de confiança).</i>	135
<i>Tabela 3.11 Valores médios dos teores de AGV obtidos à saída de FAI durante o período de operação com tempo de retenção de 2 dias e concentração de substrato crescente entre 3 e 12 g CQO/L.</i>	136
<i>Tabela 3.12 Valores médios dos teores de AGV obtidos à saída de FAII durante o período de operação com tempo de retenção de 2 dias e concentração de substrato crescente entre 3 e 12 g CQO/L.</i>	136
<i>Tabela 3.13 Dados operatórios e resultados de exploração do 1º andar de FAII durante a operação com tempo de retenção constante em 2 dias e concentração de substrato crescente (\pm intervalo com 95% de confiança).</i>	141
<i>Tabela 3.14 Dados operatórios e resultados de exploração do 2º andar de FAII durante a operação com tempo de retenção constante em 2 dias e concentração de substrato crescente (\pm intervalo com 95% de confiança).</i>	141
<i>Tabela 3.15 Dados operatórios e resultados de exploração do 3º andar de FAII durante a operação com tempo de retenção constante em 2 dias e concentração de substrato crescente (\pm intervalo com 95% de confiança).</i>	141
<i>Tabela 3.16 Distribuição de sólidos voláteis oclusos em FAI e FAII para concentrações à entrada de 3 e 9 g CQO/L.</i>	153
<i>Tabela 3.17 Velocidade superficial média do biogás produzido em FAI e em FAII para as condições de concentração de entrada de 3 000 e de 9000 mg CQO/L.</i>	167
<i>Tabela 3.18 Resultados das experiências de DTR em FAI e FAII para as concentrações de entrada de 3 e 9 g CQO/L - aplicação do modelo de dispersão.</i>	168
<i>Tabela 3.19 Resultado da aplicação do modelo compartimental de YOUNG E YOUNG (1988) na descrição do escoamento em FAI para as concentrações de entrada de 3 e de 9 g CQO/L.</i>	171
<i>Tabela 3.20 Resultado da aplicação do modelo dos tanques agitados em série e do modelo compartimental de YOUNG E YOUNG (1988) na descrição do escoamento em FAII para as concentrações de entrada de 3 e de 9 g CQO/L, respectivamente.</i>	173
<i>Tabela 3.21 Resumo da aplicação de modelos de escoamento a FAI e FAII para as concentrações de entrada de 3 e 9 g CQO/L.</i>	174
<i>Tabela 3.22 Variação dos parâmetros operatórios e de desempenho de FAI na reposição da concentração de entrada em 9000 mg CQO/L (\pm intervalo com 95% de confiança).</i>	176
<i>Tabela 3.23 Variação dos parâmetros operatórios e de desempenho de FAII na reposição da concentração de entrada em 9000 mg CQO/L (\pm intervalo com 95% de confiança).</i>	176
<i>Tabela 3.24 Transformações de azoto em FAII durante o período de operação com tempo de retenção constante e concentração de substrato crescente entre 3 e 12 g CQO/L.</i>	177
<i>Tabela 3.25 Dados operatórios e resultados de exploração de FAI durante o período de operação com concentração de substrato de 9 g CQO/L e tempo de retenção decrescente entre 2 dias e 10 horas (\pm intervalo com 95% de confiança).</i>	183

<i>Tabela 3.26 Dados operatórios e resultados de exploração de FAII durante o período de operação com concentração de substrato de 9 g CQO/L e tempo de retenção decrescente entre 2 dias e 10 horas (\pm intervalo com 95% de confiança).</i>	183
<i>Tabela 3.27 Valores médios dos AGV obtidos à saída de FAI durante o período de operação com concentração de substrato constante e tempo de retenção hidráulico decrescente.</i>	186
<i>Tabela 3.28 Valores médios dos AGV obtidos à saída de FAII durante o período de operação com concentração de substrato constante e tempo de retenção hidráulico decrescente.</i>	186
<i>Tabela 3.29 Dados operatórios e resultados de exploração do 1º andar do filtro anaeróbio segmentado (FAII) durante o período de operação com concentração de substrato de 9 g CQO/L e tempo de retenção decrescente entre 2 dias e 10 horas, com alimentação repartida (\pm intervalo com 95% de confiança).</i>	190
<i>Tabela 3.30 Dados operatórios e resultados de exploração do 2º andar do filtro anaeróbio segmentado (FAII) durante o período de operação com concentração de substrato de 9 g CQO/L e tempo de retenção decrescente entre 2 dias e 10 horas, com alimentação repartida (\pm intervalo com 95% de confiança).</i>	190
<i>Tabela 3.31 Dados operatórios e resultados de exploração do 3º andar do filtro anaeróbio segmentado (FAII) durante o período de operação com concentração de substrato de 9 g CQO/L e tempo de retenção decrescente entre 2 dias e 10 horas, com alimentação repartida (\pm intervalo com 95% de confiança).</i>	191
<i>Tabela 3.32 Variação da razão CQO/N à entrada do 2º e do 3º andares nas situações de alimentação única, dupla e tripla.</i>	194
<i>Tabela 3.33 Resultados das experiências de DTR em FAI e em cada corrente de alimentação de FAII.</i>	206
<i>Tabela 3.34 Desempenho de FAI e FAII com alimentação única e distribuída para tempo de retenção hidráulico de 10 horas e concentração de substrato de 9000 mg CQO/L.</i>	210
<i>Tabela 4.1 Tamanho dos suportes e dos mini-biorreactores utilizados na experiência I.</i>	241
<i>Tabela 4.2 Porosidade média das matrizes de cada material e de cada tamanho de suporte.</i>	241
<i>Tabela 4.3 Dimensões e características do suporte e do leito.</i>	242
<i>Tabela 4.4 Condições operatórias e desempenho do biorreactor durante a experiência I (\pm intervalo com 95% de confiança).</i>	246
<i>Tabela 4.5 Condições operatórias e desempenho do bioreactor durante a experiência II (\pm intervalo com 95% de confiança).</i>	246
<i>Tabela 4.6 Distribuição da biomassa no suporte durante a experiência II.</i>	253
<i>Tabela 5.1 Exemplos de alguns AGCL que ocorrem na natureza (adaptado de STRYER, 1981).</i>	264
<i>Tabela 5.2 Produção de metano por conversão completa do oleato nos testes de biodegradabilidade.</i>	276
<i>Tabela 5.3 Descrição do tipo de substrato alimentado aos digestores RI e RII e duração dos períodos de operação.</i>	277
<i>Tabela 5.4 Razão molar oleato/(Ca²⁺ + Mg²⁺) alimentada ao longo da operação.</i>	284
<i>Tabela 5.5 Condições operatórias nos momentos da caracterização da biomassa.</i>	285
<i>Tabela 5.6 Biomassa aderida, oclusa e total em RI e RII \pm intervalo com 95% de confiança. (diferença percentual positiva entre RI e RII).</i>	286
<i>Tabela 5.7 Taxas específicas de crescimento e rendimentos biomassa/substrato ao longo do período de operação (\pm intervalo com 95% de confiança).</i>	290

<i>Tabela 5.8 Taxas específicas máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e rendimentos biomassa/substrato ($Y_{\text{x/S}}$). Valores da literatura.</i>	291
<i>Tabela 5.9 Toxicidade do oleato de sódio sobre as bactérias metanogénicas acetoclásticas. Exemplos da literatura e comparação com os valores obtidos neste trabalho.</i>	303
<i>Tabela 5.10 Actividade metanogénica em acetato, propionato, butirato e H_2/CO_2 da matéria esbranquiçada e viscosa acumulada no topo dos digestores RI e RII.</i>	305
<i>Tabela 5.11 Comparação das taxas de degradação de oleato por biomassa adaptada, não adaptada e encapsulada.</i>	311
<i>Tabela A.1 Programação da experiência para avaliar a separação do biogás em cada andar do digestor segmentado.</i>	A.3
<i>Tabela A.2 Resultados do ensaio I. Introdução de azoto no 1º andar.</i>	A.3
<i>Tabela A.3 Resultados do ensaio II. Introdução de azoto no 2º andar.</i>	A.4
<i>Tabela A.4 Resultados do ensaio III. Introdução de azoto no 3º andar.</i>	A.4

Lista de Figuras

<i>Figura 1.1 Evolução do número de publicações referentes a “ANAEROB*”.</i>	30
<i>Figura 1.2 Evolução do número de publicações referentes a “UASB”, “ANAEROB* AND FILTER”, e “ANAEROB* AND FLUIDI*” (% do total publicado sobre anaerobiose).</i>	32
<i>Figura 1.3 Aplicação da tecnologia anaeróbia ao tratamento de efluentes industriais. Distribuição por tipo de digestor. (adaptado de HULSHOFF POL et al., 1997).</i>	34
<i>Figura 1.4 Evolução da aplicação da tecnologia anaeróbia no México, nos últimos dez anos. (Adaptado de MONROY et al., 1997).</i>	36
<i>Figura 1.5 Esquema da organização desta dissertação.</i>	40
<i>Figura 2.1 Esquema do processo de digestão anaeróbia (adaptado de GUJER E ZEHNDER, 1983). Os valores expressos em %, indicam fluxo de substrato na forma de CQO ou equivalente em metano.</i>	46
<i>Figura 2.2 Esquemas simplificados de digestores com retenção de biomassa. (a) UASB. (b) Digestor anaeróbio de leito fluidizado. (c) Processo de contacto.</i>	68
<i>Figura 2.3 Esquema do filtro anaeróbio de fluxo ascendente.</i>	71
<i>Figura 2.4. Representação esquemática de duas unidades de fluxo ideal. mistura completa (a) e escoamento pistão (b).</i>	93
<i>Figura 3.1 Representação esquemática de FAI (a) e de FAII (b).</i>	108
<i>Figura 3.2 Transdutor de pressão portátil utilizado neste procedimento.</i>	115
<i>Figura 3.3 Dados operatórios e resultados de exploração do filtro anaeróbio não segmentado (FAI) e segmentado (FAII) durante a operação sem adição de nutrientes. Carga orgânica aplicada e eficiência de remoção (a), Concentração à entrada e tempo de retenção hidráulico (b) e ácidos voláteis à saída (c).</i>	125
<i>Figura 3.4 Eficiência de remoção e carga orgânica aplicada em cada andar de FAII. 1º andar (a), 2º andar (b) e 3º andar (c). Operação sem adição de nutrientes.</i>	128
<i>Figura 3.5 Efeito da adição de nutrientes na eficiência de remoção de CQO solúvel em FAI e FAII.</i>	130
<i>Figura 3.6 Efeito da adição de nutrientes em cada andar de FAII. 1º andar (a), 2º andar (b) e 3º andar (c).</i>	132
<i>Figura 3.7 Dados operatórios e resultados de exploração do filtro anaeróbio não segmentado (FAI) e segmentado (FAII) durante a operação com tempo de retenção de 2 dias e concentração de substrato crescente entre 3 e 12 g CQO/L. Carga orgânica aplicada e eficiência de remoção (a), Concentração à entrada e tempo de retenção hidráulico (b) e ácidos voláteis à saída (c).</i>	134
<i>Figura 3.8 Comparação dos teores de sólidos voláteis à saída de FAI e de FAII durante a operação com tempo de retenção de 2 dias e concentração de substrato crescente entre 3 e 12 g CQO/L.</i>	135
<i>Figura 3.9 Comparação dos rendimentos em metano obtidos em FAI e FAII durante a operação com tempo de retenção constante.</i>	136

- Figura 3.10 Dados operatórios e resultados de exploração do 1º andar do filtro anaeróbio segmentado (FAII) durante a operação com tempo de retenção constante em 2 dias e concentração de substrato crescente entre 3 e 12 g CQO/L. Carga orgânica aplicada e eficiência de remoção (a), Concentração à entrada e tempo de retenção hidráulico (b) e ácidos voláteis à saída (c). 138*
- Figura 3.11 Dados operatórios e resultados de exploração do 2º andar do filtro anaeróbio segmentado (FAII) durante a operação com tempo de retenção constante em 2 dias e concentração de substrato crescente entre 3 e 12 g CQO/L. Carga orgânica aplicada e eficiência de remoção (a), Concentração à entrada e tempo de retenção hidráulico (b) e ácidos voláteis à saída (c). 139*
- Figura 3.12 Dados operatórios e resultados de exploração do 3º andar do filtro anaeróbio segmentado (FAII) durante a operação com tempo de retenção constante em 2 dias e concentração de substrato crescente entre 3 e 12 g CQO/L. Carga orgânica aplicada e eficiência de remoção (a), Concentração à entrada e tempo de retenção hidráulico (b) e ácidos voláteis à saída (c). 140*
- Figura 3.13 Contribuição de cada andar para a produção total de biogás em FAII durante a operação com tempo de retenção constante..... 142*
- Figura 3.14 Perfis de CQO solúvel e de CQO dos AGV em FAI (a) e FAII (b) durante a operação com TRH igual a 2 dias e concentração média à entrada de 3000 mg CQO/L. 143*
- Figura 3.15 Perfis de CQO solúvel e de CQO dos AGV em FAI (a) e FAII (b) durante a operação com TRH igual a 2 dias e concentração média à entrada de 6000 mg CQO/L. 144*
- Figura 3.16 Perfis de CQO solúvel e de CQO dos AGV em FAI (a) e FAII (b) durante a operação com TRH igual a 2 dias e concentração média à entrada de 9000 mg CQO/L. 145*
- Figura 3.17 Perfis de CQO solúvel e de CQO dos AGV em FAI (a) e FAII (b) durante a operação com TRH igual a 2 dias e concentração média à entrada de 12000 mg CQO/L. 146*
- Figura 3.18 Perfis de AGV em FAI (a) e FAII(b) durante a operação com TRH igual a 2 dias e concentração média à entrada de 3000 mg CQO/L. 148*
- Figura 3.19 Perfis de AGV em FAI (a) e FAII(b) durante a operação com TRH igual a 2 dias e concentração média à entrada de 6000 mg CQO/L. 149*
- Figura 3.20 Perfis de AGV em FAI (a) e FAII(b) durante a operação com TRH igual a 2 dias e concentração média à entrada de 9000 mg CQO/L. 150*
- Figura 3.21 Perfis de AGV em FAI (a) e FAII(b) durante a operação com TRH igual a 2 dias e concentração média à entrada de 12 000 mg CQO/L..... 151*
- Figura 3.22 Distribuição da actividade metanogénica acetodástica em FAI (a) e FAII (b) para concentrações à entrada de 3 e 9 g CQO/L..... 154*
- Figura 3.23 Distribuição da actividade metanogénica hidrogenofílica em FAI (a) e FAII (b) para concentrações à entrada de 3 e 9 g CQO/L..... 155*
- Figura 3.24 Distribuição da actividade acidogénica em lactose em FAI (a) e FAII (b) para concentrações à entrada de 3 e 9 g CQO/L..... 156*
- Figura 3.25 Distribuição da actividade metanogénica em propionato em FAI (a) e FAII (b) para concentrações à entrada de 3 e 9 g CQO/L..... 158*
- Figura 3.26 Distribuição da actividade metanogénica em butirato em FAI (a) e FAII (b) para concentrações à entrada de 3 e 9 g CQO/L..... 159*

- Figura 3.27 Fotografias obtidas num microscópio óptico de fluorescência (a) Bactérias autofluorescentes semelhantes a Methanospirillum (1º andar de FAII), (b) floco com bactérias autofluorescentes, (c) biomassa no início de operação, (d) biomassa após 590 dias de operação. 160*
- Figura 3.28 Aspecto dos agregados formados em FAI e em FAII para a concentração de entrada de 9 g CQO/L e TRH= 2 dias. (a) topo FAI, (b) meio de FAI, (c) base de FAI, (d) 3º andar de FAII, (e) 2º andar de FAII, (f) 1º andar de FAII. Em todas, com excepção da foto (e), a barra representa 10 µm. Na foto (e) a barra representa 5 µm. 161*
- Figura 3.29 Distribuição do tamanho dos agregados em FAI (a) e FAII (b) para concentrações à entrada de 3 e 9 g CQO/L. 162*
- Figura 3.30 Distribuição da velocidade de sedimentação dos agregados em FAI (a) e FAII (b) para concentrações à entrada de 3 e 9 g CQO/L. 163*
- Figura 3.31 Relação entre a actividade metanogénica em propionato e a velocidade de sedimentação dos agregados microbianos presentes em FAI e em FAII. 164*
- Figura 3.32 Distribuição da dimensão fractal dos agregados em FAI (a) e FAII (b) para concentrações à entrada de 3 e 9 g CQO/L. 165*
- Figura 3.33 Exemplo de agregados visualizados no sistema de análise de imagem. Imagens adquiridas (a). Imagens digitalizadas (b). 167*
- Figura 3.34 Representação do modelo de três parâmetros utilizado na modelação do escoamento nos digestores (YOUNG E YOUNG, 1988). 169*
- Figura 3.35 Aplicação de um modelo compartimental de três parâmetros para a descrição do escoamento em FAI para a concentração de entrada de 3 g CQO/L (a) e de 9 g CQO/L (b). 170*
- Figura 3.36 Aplicação do modelo dos tanques agitados em série para a descrição do escoamento em FAII para a concentração de entrada de 3 g CQO/L. 172*
- Figura 3.37 Aplicação de um modelo compartimental de três parâmetros para a descrição do escoamento em FAII para a concentração de entrada de 9 g CQO/L. 172*
- Figura 3.38 Perfis de pH ao longo da altura de FAII, durante o período de operação com tempo de retenção constante e concentração de substrato crescente entre 3 e 12 g CQO/L. 175*
- Figura 3.39 Distribuição do caudal ao longo de FAII(a) alimentação dupla com sobrecarga do 2º andar ($B_v=13$ kg CQO/m³.dia). (b) alimentação distribuída ($B_v=13$ kg CQO/m³.dia). (c) alimentação distribuída ($B_v=20$ kg CQO/m³.dia). 180*
- Figura 3.40 Variação do tempo de retenção hidráulico em cada andar de FAII durante o período de operação com alimentação lateral repartida. 180*
- Figura 3.41 Dados operatórios e resultados de exploração do filtro anaeróbio não segmentado (FAI) e segmentado (FAII) durante a operação com concentração de substrato de 9 g CQO/L e tempo de retenção hidráulico decrescente entre 2 dias e 10 horas. Carga orgânica aplicada e eficiência de remoção (a), Concentração à entrada e tempo de retenção hidráulico (b) e ácidos voláteis à saída (c). 182*
- Figura 3.42 Variação da eficiência de remoção de CQO solúvel com o tempo de retenção hidráulico em FAI e FAII durante o período de operação com concentração de substrato de 9 g CQO/L e tempo de retenção hidráulico decrescente entre 2 dias e 10 horas. 184*
- Figura 3.43 Variação da carga orgânica removida com a carga orgânica aplicada em FAI e FAII durante o período de operação com concentração de substrato de 9 g CQO/L e tempo de retenção decrescente entre 2 dias e 10 horas. 184*

- Figura 3.44 Variação dos teores de sólidos voláteis à saída de FAI e de FAII com o tempo de retenção hidráulico durante o período de operação com concentração de substrato de 9 g CQO/L e tempo de retenção hidráulico decrescente entre 2 dias e 10 horas. 185*
- Figura 3.45 Comparação dos rendimentos médios em metano obtidos em FAI e em FAII durante o período de operação com concentração de substrato de 9 gCQO/L e tempo de retenção hidráulico decrescente entre 2 dias e 10 horas. 185*
- Figura 3.46 Dados operatórios e resultados de exploração do 1º andar do filtro anaeróbio segmentado (FAII) durante o período de operação com concentração de substrato de 9 g CQO/L e tempo de retenção decrescente entre 2 dias e 10 horas, com alimentação repartida. Carga orgânica aplicada e eficiência de remoção (a), concentração à entrada e tempo de retenção hidráulico (b) e ácidos voláteis à saída (c)..... 187*
- Figura 3.47 Dados operatórios e resultados de exploração do 2º andar do filtro anaeróbio segmentado (FAII) durante o período de operação com concentração de substrato de 9 g CQO/L e tempo de retenção decrescente entre 2 dias e 10 horas, com alimentação repartida. Carga orgânica aplicada e eficiência de remoção (a), concentração à entrada e tempo de retenção hidráulico (b) e ácidos voláteis à saída (c)..... 188*
- Figura 3.48 Dados operatórios e resultados de exploração do 3º andar do filtro anaeróbio segmentado (FAII) durante o período de operação com concentração de substrato de 9 g CQO/L e tempo de retenção decrescente entre 2 dias e 10 horas, com alimentação repartida. Carga orgânica aplicada e eficiência de remoção (a), concentração à entrada e tempo de retenção hidráulico (b) e ácidos voláteis à saída (c)..... 189*
- Figura 3.49 Variação da carga orgânica removida com a carga orgânica aplicada em cada andar de FAII durante o período de operação com concentração de 9 g CQO/L constante e tempo de retenção decrescente entre 2 dias e 10 horas. 192*
- Figura 3.50 Variação da carga orgânica removida com a carga orgânica aplicada no conjunto do 1º e 2º andares de FAII durante o período de operação com concentração de substrato de 9 g CQO/L e tempo de retenção decrescente entre 2 dias e 10 horas. Comparação com a configuração convencional..... 192*
- Figura 3.51 Variação ao longo do tempo do pH à saída de cada andar durante o período operatório com concentração de substrato constante e tempo de retenção decrescente. 193*
- Figura 3.52 Balanços ao azoto e CQO para cálculo das razões CQO/N à entrada de cada andar na situação de alimentação dupla (a) e alimentação tripla (b). 194*
- Figura 3.53 Distribuição da actividade metanogénica acetoclástica em FAII na situação de alimentação dupla e tripla (a) e em FAI (b) para a operação com tempo de retenção de 16 horas e concentração à entrada de 9000 mg CQO/L..... 196*
- Figura 3.54 Distribuição da actividade metanogénica hidrogenofílica em FAII na situação de alimentação dupla e tripla (a) e em FAI (b) para a operação com tempo de retenção de 16 horas e concentração à entrada de 9000 mg CQO/L..... 197*
- Figura 3.55 Distribuição da actividade acidogénica em lactose em FAII na situação de alimentação dupla e tripla (a) e em FAI (b) para a operação com tempo de retenção de 16 horas e concentração à entrada de 9000 mg CQO/L..... 198*
- Figura 3.56 Distribuição da actividade metanogénica em propionato em FAII na situação de alimentação dupla e tripla (a) e em FAI (b) para a operação com tempo de retenção de 16 horas e concentração à entrada de 9000 mg CQO/L..... 199*
- Figura 3.57 Distribuição da actividade metanogénica em butirato em FAII na situação de alimentação dupla e tripla (a) e em FAI (b) para a operação com tempo de retenção de 16 horas e concentração à entrada de 9000 mg CQO/L..... 200*

<i>Figura 3.58 Distribuição do tamanho dos agregados em FAII na situação de alimentação dupla e tripla (a) e em FAI (b) para a operação com tempo de retenção de 16 horas e concentração à entrada de 9000 mg CQO/L.....</i>	<i>201</i>
<i>Figura 3.59 Distribuição da velocidade de sedimentação dos agregados em FAII na situação de alimentação dupla e tripla (a) e em FAI (b) para a operação com tempo de retenção de 16 horas e concentração à entrada de 9000 mg CQO/L.</i>	<i>203</i>
<i>Figura 3.60 Relação entre a actividade metanogénica em propionato e a velocidade de sedimentação dos agregados microbianos presentes em FAI e em FAII.</i>	<i>203</i>
<i>Figura 3.61 Distribuição da dimensão fractal dos agregados em FAII na situação de alimentação dupla e tripla (a) e em FAI (b) para a operação com tempo de retenção de 16 horas e concentração à entrada de 9000 mg CQO/L.....</i>	<i>204</i>
<i>Figura 3.62 Esquema da alimentação dos digestores na situação de alimentação única em FAI (a) e distribuída em FAII (b) para tempo de retenção hidráulico de 10 horas.</i>	<i>205</i>
<i>Figura 3.63 Experiência de DTR em FAI para tempo de retenção hidráulico de 10 horas. Aplicação do modelo de dispersão.</i>	<i>207</i>
<i>Figura 3.64 Experiência de DTR na corrente alimentada no 1º andar de FAII para tempo de retenção hidráulico de 10 horas. Aplicação do modelo de dispersão.....</i>	<i>207</i>
<i>Figura 3.65 Experiência de DTR na corrente alimentada no 2º andar de FAII para tempo de retenção hidráulico de 10 horas. Aplicação do modelo de dispersão.....</i>	<i>207</i>
<i>Figura 3.66 Experiência de DTR na corrente alimentada no 3º andar de FAII para tempo de retenção hidráulico de 10 horas. Aplicação do modelo de dispersão.....</i>	<i>208</i>
<i>Figura 3.67 Esquema da alimentação dos digestores na situação de alimentação distribuída em FAI (a) e única FAII (b) para tempo de retenção hidráulico de 10 horas.</i>	<i>209</i>
<i>Figura 3.68 Variação da eficiência de remoção de CQO ao longo do tempo durante o período de operação com tempo de retenção de 10 horas.</i>	<i>209</i>
<i>Figura 3.69 Eficiência de remoção e carga orgânica aplicada em cada andar de FAII. 1º andar (a), 2º andar (b) e 3º andar (c).....</i>	<i>211</i>
<i>Figura 3.70 Distribuição da biomassa oclusa ao longo da altura de FAI e de FAII no final da operação.....</i>	<i>212</i>
<i>Figura 3.71 Distribuição da biomassa aderida ao longo da altura de FAI e de FAII no final da operação.....</i>	<i>212</i>
<i>Figura 3.72 Distribuição da fracção de biomassa aderida ao longo da altura de FAI e de FAII no final da operação.</i>	<i>213</i>
<i>Figura 3.73 Distribuição de fracção de sólidos voláteis ao longo da altura de FAI e de FAII no final da operação.</i>	<i>214</i>
<i>Figura 3.74 Distribuição de actividade metanogénica acetodástica ao longo da altura de FAI e de FAII no final da operação.</i>	<i>215</i>
<i>Figura 3.75 Distribuição da actividade metanogénica hidrogenofílica ao longo da altura de FAI e de FAII no final da operação.</i>	<i>216</i>
<i>Figura 3.76 Distribuição de actividade acidogénica em lactose ao longo da altura de FAI e de FAII no final da operação.</i>	<i>216</i>
<i>Figura 3.77 Distribuição de actividade metanogénica em propionato ao longo da altura de FAI e de FAII no final da operação.</i>	<i>217</i>

<i>Figura 3.78 Distribuição do tamanho dos agregados ao longo da altura de FAI e de FAII no final da operação.</i>	218
<i>Figura 3.79 Distribuição da velocidade de sedimentação dos agregados ao longo da altura de FAI e de FAII no final da operação.</i>	218
<i>Figura 3.80 Distribuição da dimensão fractal dos agregados ao longo da altura de FAI e de FAII no final da operação.</i>	219
<i>Figura 3.81 Variação ao longo do tempo da actividade metanogénica acetoclástica em cada secção de FAI (a) e de FAII (b).</i>	220
<i>Figura 3.82 Variação ao longo do tempo da actividade metanogénica hidrogenofílica em cada secção de FAI (a) e de FAII (b).</i>	221
<i>Figura 3.83 Variação ao longo do tempo da actividade acidogénica em lactose em cada secção de FAI (a) e de FAII (b).</i>	222
<i>Figura 3.84 Variação ao longo do tempo da actividade metanogénica em propionato em cada secção de FAI (a) e de FAII (b).</i>	223
<i>Figura 3.85 Variação ao longo do tempo da actividade metanogénica em butirato em cada secção de FAI (a) e de FAII (b).</i>	224
<i>Figura 3.86 Variação ao longo do tempo do diâmetro equivalente dos agregados em cada secção de FAI (a) e de FAII (b).</i>	225
<i>Figura 3.87 Variação ao longo do tempo da velocidade de sedimentação dos agregados em cada secção de FAI (a) e de FAII (b).</i>	226
<i>Figura 3.88 Variação ao longo do tempo da dimensão fractal dos agregados em cada secção de FAI (a) e de FAII (b).</i>	227
<i>Figura 4.1 Representação esquemática da instalação experimental.</i>	239
<i>Figura 4.2 Vista da secção do biorreactor na experiência I.</i>	241
<i>Figura 4.3 Vista da secção do biorreactor na experiência II.</i>	242
<i>Figura 4.4 Dados operatórios e resultados de exploração do digestor proposto para estudos de biomassa, durante a experiência II. Carga orgânica aplicada e eficiência de remoção (a), concentração à entrada e tempo de retenção hidráulico (b) e CQO solúvel e CQO dos ácidos voláteis na corrente de saída (c).</i>	247
<i>Figura 4.5 Efeito do tipo de material e do tamanho de suporte na concentração de biomassa total.</i>	248
<i>Figura 4.6 Efeito do tipo de material e do tamanho de suporte na concentração de biomassa oclusa.</i>	249
<i>Figura 4.7 Efeito do tipo de material e do tamanho de suporte na concentração de biomassa aderida.</i>	249
<i>Figura 4.8 Efeito do tipo de material e do tamanho de suporte na fracção de biomassa aderida.</i>	250
<i>Figura 4.9 Efeito da velocidade intersticial na concentração de biomassa oclusa (a) e de biomassa aderida(b).</i>	251
<i>Figura 4.10 Fotografias obtidas num microscópio electrónico de varrimento. Superfícies colonizadas de vidro (a), vidro acrílico (b) e PVC (c). Superfícies limpas de vidro (d), vidro acrílico (e) e PVC (f). Em todas as fotografias a barra representa 10 μm.</i>	252
<i>Figura 4.11 Evolução da fracção de biomassa aderida ao longo da operação durante a experiência II.</i>	254
<i>Figura 4.12 Evolução da actividade metanogénica específica em acetato (a) e em H_2/CO_2 (b).</i>	255
<i>Figura 4.13 Actividade metanogénica específica em substratos indirectos: propionato (a), butirato (b) e etanol (c).</i>	256

<i>Figura 5.1 Mecanismo proposto por WENG E JERIS (1976) para a degradação do oleato (mecanismo de degradação 1).</i>	265
<i>Figura 5.2 Mecanismo proposto por WENG E JERIS (1976) para a degradação do oleato (mecanismo de degradação 2).</i>	265
<i>Figura 5.3 Resultados da operação de um filtro anaeróbio laboratorial. Eficiência de remoção e carga orgânica aplicada (a). Teores de AGV na corrente de saída (b).</i>	269
<i>Figura 5.4 Exemplo do cálculo gráfico da duração da fase de latência.</i>	274
<i>Figura 5.5 Cálculo gráfico do índice de toxicidade (IC_{50}).</i>	274
<i>Figura 5.6 Definição da taxa média de metanização obtida nos testes de biodegradabilidade.</i>	276
<i>Figura 5.7 Condições operatórias e desempenho dos digestores RI e RII. Eficiência de remoção e carga orgânica aplicada (a), CQO total e do oleato alimentada (b) e ácidos voláteis na corrente de saída (c).</i>	279
<i>Figura 5.8 Variação da concentração média de AGV totais à saída com a carga orgânica aplicada a RI e RII durante o período I de operação.</i>	280
<i>Figura 5.9 Variação da concentração média de AGV totais à saída com a concentração de oleato na alimentação durante os períodos II e III de operação.</i>	280
<i>Figura 5.10 Variação da concentração de substrato não acidificado à saída de RI e de RII com a carga orgânica aplicada, durante o período I de operação.</i>	281
<i>Figura 5.11 Variação da concentração de substrato não acidificado à saída de RI e de RII com a concentração de oleato à entrada, durante os períodos II e III de operação.</i>	282
<i>Figura 5.12 Efeito da biomassa oclusa na concentração de biomassa à saída de RI e RII.</i>	287
<i>Figura 5.13 Evolução da fracção de biomassa aderida em RI e RII.</i>	288
<i>Figura 5.14 Biomassa total retida no suporte de RI e RII ao longo do tempo de operação.</i>	289
<i>Figura 5.15 Evolução da actividade metanogénica acetoclástica (a) e hidrogenofílica (b) em RI e RII.</i>	292
<i>Figura 5.16 Evolução da actividade metanogénica em propionato (a), butirato (b) e etanol (c) em RI e RII.</i>	295
<i>Figura 5.17 Toxicidade do oleato de sódio sobre as bactérias metanogénicas acetoclásticas e hidrogenofílicas presentes no inóculo.</i>	296
<i>Figura 5.18 Produção específica de metano durante um teste de toxicidade (biomassa retirada de RI nos dias 162 (a) e 212 (b)).</i>	298
<i>Figura 5.19 Produção específica de metano durante um teste de toxicidade (biomassa retirada de RII nos dias 162 (a) e 212 (b)).</i>	299
<i>Figura 5.20 - Evidência do comportamento diáuxico da biomassa retirada de RII no dia 162.</i>	300
<i>Figura 5.21 Índice de toxicidade do oleato de sódio sobre as bactérias metanogénicas acetoclásticas. Evolução ao longo do tempo de operação.</i>	301
<i>Figura 5.22 Evolução das fases de latência observadas nos testes de toxicidade da biomassa de RI (a) e de RII (b).</i>	304
<i>Figura 5.23 Evolução da quantidade de substrato residual que acompanhou a biomassa de RI e RII, ao longo do período de operação.</i>	306
<i>Figura 5.24. Variação entre a taxa de degradação e a concentração do substrato residual.</i>	307

<i>Figura 5.25 Produção específica de metano em reactor fechado sem adição de substrato pela biomassa de RI e RII, no final da operação.</i>	<i>308</i>
<i>Figura 5.26 Evolução da taxa média de metanização do oleato de sódio ao longo do tempo de operação.</i>	<i>309</i>
<i>Figura 5.27 Taxa de degradação do oleato, medida em ensaios em reactor fechado. Comparação entre a biomassa de RI e uma biomassa que não tinha sido exposta a lípidos durante três anos.</i>	<i>310</i>
<i>Figura 5.28 Fases de latência observadas nos ensaios de biodegradabilidade com a biomassa de RI.</i>	<i>310</i>
<i>Figura 5.29 Ensaio de biodegradabilidade do ácido oleico com biomassa retirada do reactor RI no final da operação.</i>	<i>312</i>
<i>Figura A.1 Esquema do digestor segmentado.</i>	<i>A.2</i>
<i>Figura B.1 Esquema da ligação das linhas de gás ao espectrómetro de massa.</i>	<i>A.7</i>
<i>Figura B.2 Espectros de massas para os componentes puros.</i>	<i>A.9</i>
<i>Figura C.1 Exemplo de uma curva de calibração do transdutor de pressão.</i>	<i>A.12</i>

Lista de Símbolos

LETRAS LATINAS

$C(t)$	<i>concentração “versus” tempo</i>	
D	<i>coeficiente de dispersão longitudinal</i>	(L^2T^{-1})
$E(\Theta)$	<i>função distribuição de tempos de residência adimensional</i>	
$E(t)$	<i>função distribuição de tempos de residência</i>	(T^{-1})
J	<i>número de tanques agitados em série</i>	
L	<i>comprimento</i>	(L)
Pe	<i>número de Peclet</i>	
Q	<i>caudal</i>	L^3T^{-1}
S_0	<i>concentração de substrato à entrada do digestor</i>	(ML^{-3})
S	<i>concentração de substrato na corrente de saída</i>	(ML^{-3})
u	<i>velocidade superficial do líquido</i>	(LT^{-1})
V	<i>volume de reator</i>	(L^3)
x_R	<i>concentração de sólidos voláteis na matriz de suporte</i>	(ML^{-3})
x_S	<i>concentração de sólidos voláteis à saída do reator</i>	(ML^{-3})
$Y_{x/S}$	<i>rendimento biomassa/substrato</i>	

LETRAS GREGAS

β	<i>fração de volume “morto” no modelo de escoamento</i>	
μ	<i>taxa específica de crescimento</i>	(T^{-1})
$\mu_{m\acute{a}x}$	<i>taxa específica máxima de crescimento</i>	(T^{-1})
τ_{a1}, τ_{a2}	<i>tempos de retenção das unidades de mistura perfeita no modelos de escoamento</i>	(T)
Θ	<i>tempo adimensional</i>	
τ	<i>tempo de passagem considerado nos modelos de escoamento</i> = V/Q	(T)
τ_p	<i>tempo de retenção da unidade de fluxo pistão no modelo de escoamento</i>	(T)

SIGLAS

AGCL	<i>Ácidos Gordos de Cadeia Longa</i>	
AGV	<i>Ácidos Gordos Voláteis</i>	
ATP	<i>Adenosina tri-fosfato</i>	
Bv	<i>Carga Orgânica Aplicada.....</i>	$(ML^{-3} T^{-1})$
CQO	<i>Carência Química de Oxigênio.....</i>	(ML^{-3})
EGSB	<i>Digestor anaeróbio de manto de lamas de leito expandido</i>	
ETAR	<i>Estação de Tratamento de Águas Residuais</i>	
F420	<i>Coenzima presente nas bactérias metanogénicas</i>	
FAI	<i>Filtro anaeróbio não segmentado</i>	
FAII	<i>Filtro anaeróbio segmentado</i>	
FVM	<i>Fracção de Volume “Morto” nos digestores</i>	
GC	<i>Cromatografia gasosa</i>	
HPLC	<i>Cromatografia líquida de alta eficiência</i>	
IC	<i>Reactor de Recirculação Interna</i>	
IC ₅₀	<i>Índice de toxicidade</i>	
PTN	<i>Pressão e Temperatura Normais</i>	
RI	<i>Digestor anaeróbio de leito fixo alimentado com lípidos</i>	
RII	<i>Digestor anaeróbio de leito fixo alimentado sem lípidos</i>	
SSV	<i>Sólidos Suspensos Voláteis.....</i>	(ML^{-3})
ST	<i>Sólidos Totais.....</i>	(ML^{-3})
SV	<i>Sólidos Voláteis.....</i>	(ML^{-3})
TRH	<i>Tempo de Retenção Hidráulico nos digestores.....</i>	(T)
TRM	<i>Tempo de Residência Médio.....</i>	(T)
TRS	<i>Tempo de Retenção de Sólidos.....</i>	(T)
UASB	<i>Digestor anaeróbio de manto de lamas de fluxo ascendente</i>	

NOTAS:

1. Por uma questão de legibilidade, optou-se por capitalizar a letra que designa a unidade *litro*. Assim, o convencional l é substituído por L.
2. As unidades da Carência Química de Oxigênio, que, em rigor, devem ser mgO₂/L ou gO₂/L são substituídas por mg/L ou g/L ou mesmo por mgCQO/L ou gCQO/L.

1. Introdução

Sumário

Após uma síntese do estado actual da aplicação da digestão anaeróbia a nível mundial, salientam-se os avanços tecnológicos dos últimos anos e referem-se as tendências actuais da investigação neste domínio. Por último, são apresentados os objectivos deste trabalho e o esquema que traduz a organização desta dissertação cujo fio condutor é o estudo de digestores anaeróbios de leito fixo aplicados ao tratamento de efluentes lácteos, com especial relevo para o estudo das características da biomassa

Índice

1.1	ENQUADRAMENTO	27
1.2	OBJECTIVOS	39
1.3	ESTRUTURA E ORGANIZAÇÃO DA TESE	40

1.1 Enquadramento

1.1.1 Novas perspectivas no tratamento de efluentes

Na última Conferência Internacional de Digestão Anaeróbia realizada em Maio de 1997 no Japão, o grupo holandês liderado por GATZE LETTINGA apresentou uma visão enaltecadora dos processos de tratamento anaeróbio de efluentes (LETTINGA *et al.*, 1997 a). Na sua comunicação, a aplicação dos sistemas convencionais de tratamento de efluentes domésticos foi questionada, considerada não sustentada e economicamente não atractiva, sendo proposta a separação das fracções mais concentradas dos efluentes domésticos, o seu tratamento diferenciado e a descentralização das grandes unidades de lamas activadas, consideradas tecnicamente sofisticadas e de elevado custo. Sugeriram que a digestão anaeróbia, embora sempre encarada como um pré-tratamento, oferece enormes possibilidades especialmente quando aplicada em sistemas descentralizados à escala de comunidades locais (“*small is beautiful*”) e referiram a actual disponibilidade de vários tipos de digestores de alta carga nomeadamente os digestores UASB, EGSB e os filtros anaeróbios (ver descrição nos **sub-Capítulos 2.2 e 2.3**, páginas **66 e 71**), salientando ainda os sistemas segmentados, que, segundo os autores, são especialmente interessantes no tratamento de efluentes complexos.

Também recentemente, HENZE (1997), referiu a tendência do tratamento de efluentes se encaminhar para dois extremos: por um lado a aplicação de sistemas locais, simples e de baixo custo e por outro lado a centralização em unidades de tratamento tecnicamente sofisticadas. Realçou ainda a necessidade de considerar os efluentes como recursos aproveitáveis nomeadamente para produção de biogás e referiu que os tradicionais critérios de qualidade devem ser substituídos por um eficiente controlo da qualidade do efluente final.

VERSTRAETE E VANDEVIVERE (1997) consideram como um desafio para as próximas décadas fazer entender aos engenheiros sanitários que os efluentes domésticos podem ser conveniente e vantajosamente tratados por um processo sequencial anaeróbio/aeróbio.

Estas visões, algo futuristas, realçam as vantagens, tradicionalmente referidas na literatura, dos processos anaeróbios face aos aeróbios e que se enumeram a seguir (LETTINGA *et al.*, 1980, OLTHOLF E OLESZKIEWICZ, 1983, ECKENFELDER *et al.*, 1988):

- menores produções de sólidos, dado que o rendimento biomassa/substrato da biomassa anaeróbia (aproximadamente 0.1 kg sólidos suspensos voláteis/kg CQOremovido), é cerca de 5 vezes inferior ao correspondente valor da biomassa aeróbia;
- menor necessidade em nutrientes devido à menor produção celular da biomassa anaeróbia;
- menor necessidade energética, porque não é necessária potência para arejamento, sendo também muitas vezes desnecessária uma agitação mecânica devido aos elevados caudais de gás produzido;
- obtenção de metano, o principal produto final resultante da estabilização da matéria orgânica via anaerobiose, que pode tornar o processo excedentário em energia, dependendo, essencialmente, da concentração de substrato e da temperatura de operação;
- capacidade da biomassa preservar a sua actividade após longos períodos (vários meses), sem operar, o que é especialmente importante no caso de efluentes de indústrias sazonais;
- tolerância a condições ambientais adversas, tais como baixas temperaturas, $< 10^{\circ}\text{C}$, (VAN LIER *et al.*, 1997) e presença de tóxicos (RAZO-FLORES *et al.*, 1997).

Já no início dos anos noventa, COLLIVIGNARELLI *et al.* (1990, 1991) descreveram uma unidade integrada à escala piloto, situada em Itália para tratamento de efluentes domésticos, baseada no tratamento anaeróbio com pós tratamento aeróbio. Referiram as vantagens deste processo face aos tradicionais sistemas de lamas activadas, salientando os elevados custos energéticos destes últimos processos de tratamento. De facto, e como exemplo ilustrativo, os custos energéticos de uma estação de tratamento de águas residuais tradicional para 130 000 habitantes-equivalentes, sem tratamento terciário situa-se actualmente em cerca de 1500 000 escudos/mês.

O recentes avanços na tecnologia da digestão anaeróbia, nomeadamente no projecto e operação de digestores, a par da evolução no conhecimento da bioquímica microbiana, fisiologia e ecologia do processo têm vindo a reduzir as limitações tradicionalmente referidas para os processos anaeróbios, nomeadamente longos períodos de tempo para o arranque, longos tempos de retenção, sensibilidade a tóxicos e instabilidade (LETTINGA *et al.*, 1980, ECKENFELDER *et al.*, 1988). Desde que se aplique a tecnologia adequada, se proceda a uma aclimatização do consórcio e se mantenham as condições ambientais óptimas, o processo de digestão anaeróbia poderá ser, num futuro próximo, aplicado ao pré-tratamento

de qualquer tipo de efluente, industrial ou doméstico, complexo ou não complexo, muito concentrado em matéria orgânica ou muito diluído, numa gama alargada de temperatura, (LETTINGA *et al.*, 1997 b). Segundo este autor, com o aumento do número de digestores será maior a disponibilidade de inóculos aclimatizados a determinados efluentes, o que reduzirá o tempo necessário para o arranque de novas instalações. No entanto o mesmo autor (LETTINGA, 1995) reconheceu que o primeiro arranque é delicado, nomeadamente se envolver a fase de granulação (no caso do digestor do tipo manto de lamas - UASB) e aconselhou que tal deve ser, na prática, realizado por pessoal especializado.

Embora actualmente a aplicação do processo de degradação anaeróbia ainda esteja muito centrada no tratamento de efluentes de indústrias alimentares e relacionadas, investigações recentes têm demonstrado que as bactérias envolvidas no processo têm capacidade para degradar uma larga gama de compostos orgânicos recalcitrantes tais como compostos aromáticos policíclicos, compostos orgânicos clorados ou ácidos gordos de cadeia longa (COLLERAN, comunicação pessoal, 1996).

1.1.2 A investigação em digestão anaeróbia

A aplicação do processo de degradação anaeróbia a efluentes industriais pouco concentrados em matéria orgânica e com compostos recalcitrantes ou potencialmente inibitórios para os grupos bacterianos envolvidos no processo, durante muitos anos considerada não exequível, é actualmente um dos centros de interesse da investigação em digestão anaeróbia (COLLERAN *et al.*, 1995, VERSTRAETE E VANDEVIVERE, 1997). A possibilidade de “construir” consórcios específicos para degradar determinados compostos tóxicos de modo a acelerar o natural processo de adaptação tem sido considerada como um dos desafios para um futuro próximo da investigação neste campo (VERSTRAETE E VANDEVIVERE, 1997). A co-inoculação de culturas puras capazes de degradar determinados compostos pode ser eficientemente utilizada para esse efeito (AHRING *et al.*, 1992). Além disso, todos os aspectos relacionados com a formação e deterioração granulares são, actualmente alvo de interesse científico (ALPHENAAR, 1994, FANG, 1997).

É importante conhecer a sensibilidade dos microorganismos envolvidos no processo de digestão anaeróbia a diferentes compostos potencialmente inibitórios, e avaliar a

necessidade de adaptação. Os testes de toxicidade devem ser conduzidos em condições ambientais relevantes, mantendo os microorganismos como parte do consórcio anaeróbio e não em cultura pura. Por exemplo, as bactérias metanogénicas, consideradas microorganismos extremamente sensíveis em cultura pura, quando inseridos num consórcio metanogénico, revelaram-se mais resistentes aos efeitos tóxicos do fenol do que as bactérias sulfato-redutoras (WATSON-CRAIK E STAMS, 1995).

A investigação em anaerobiose de um modo geral tem aumentado nos últimos anos, embora este aumento possa ser considerado consequente da crescente tendência do número de trabalhos publicados em todos os domínios científicos. O número de publicações referentes a “ANAEROB*” que constam no *Biotechnology Citation Index (BCI)* duplicou entre 1991 e 1997 (Figura 1.1).

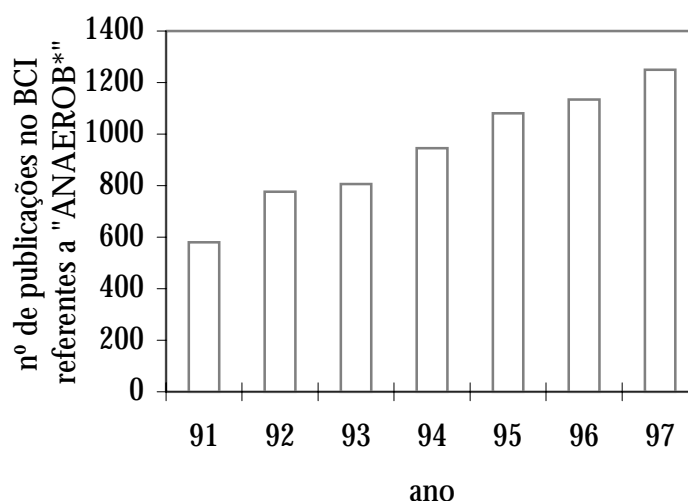


Figura 1.1 Evolução do número de publicações referentes a “ANAEROB*”.

Exceptuando os processos que ocorrem na natureza, o tratamento de efluentes é, por excelência, o campo em que a anaerobiose se aplica na sua vertente mais complexa, não sendo ainda completamente conhecidas as bases microbiológicas e bioquímicas do processo, especialmente se aplicado ao tratamento de substâncias recalcitrantes e/ou tóxicas (LETTINGA, 1996). Ainda recentemente HOBSON E WHEATLEY (1993) consideravam que para desenvolver a tecnologia em digestão anaeróbia não era necessário conhecer as bactérias

envolvidas no processo de degradação. Esta opinião foi fortemente contestada pelos delegados do 7º Simpósio Internacional sobre Digestão Anaeróbia que se realizou na Cidade do Cabo, África do Sul, em Janeiro de 1994, organizada pela IAWQ (“*International Association on Water Quality*”) (WATSON-CRAIK E STAMS, 1995). De facto, neste simpósio concluiu-se que o desenvolvimento de novas tecnologias ainda tem sido limitado pela falta de conhecimento em áreas chave tais como a microbiologia do desenvolvimento, estrutura e estabilidade dos agregados granulares de biomassa, essenciais ao funcionamento dos digestores do tipo manto de lamas (UASB/EGSB).

Contudo, nos últimos anos, assistiu-se a enormes avanços no desenvolvimento da tecnologia em digestão anaeróbia, nomeadamente no desenho de reactores de alta carga em que a biomassa é retida por adesão a suportes, granulação ou reciclagem (IZA *et al.*, 1991). Desde o final dos anos sessenta, com o aparecimento do filtro anaeróbio de fluxo ascendente (YOUNG E MCCARTY, 1967), até à actualidade, surgiram novas configurações de digestores, nomeadamente filtros anaeróbios de fluxo descendente (VAN DEN BERG E LENTZ, 1979), reactores anaeróbios de leito fluidizado (SWITZENBAUM E JEWEL, 1980), reactores de fluxo ascendente de manto de lamas (UASB) (LETTINGA *et al.*, 1980), fusões tipo reactor híbrido (UASB + Filtro) (GUIOT E VAN DEN BERG, 1985, REYNOLDS E COLLERAN, 1986) e EGSB (UASB com leito expandido) (DE MAN *et al.*, 1988) e ainda reactores segmentados em vários andares (GUIOT *et al.*, 1995, VAN LIER *et al.*, 1994, GROBICKI E STUCKEY, 1991). Os processos segmentados, com separação de biomassa e biogás em cada compartimento, têm recentemente, sido alvo de interesse científico. LETTINGA (1995), salientou as vantagens de segmentar o processo em vários módulos, no sentido de favorecer o desenvolvimento de consórcios bacterianos específicos em cada módulo, capazes de realizar cada etapa do processo de uma forma mais eficiente e com maior estabilidade. Referiu mais recentemente que estes sistemas são particularmente atractivos para o tratamento de efluentes complexos (LETTINGA *et al.*, 1997). Também SPEECE *et al.*, (1997) se referiram às vantagens de segmentar o processo em vários compartimentos, nomeadamente a optimização das condições ambientais para a acidogénese e metanogénese, a alteração da distribuição dos intermediários e a minimização da concentração de hidrogénio. No **Capítulo 3** desta dissertação são apresentados dados comparativos entre dois digestores anaeróbios de leito fixo, sendo um segmentado em três

andares e outro não segmentado. As características físicas e microbiológicas da biomassa desenvolvida em cada secção dos digestores são apresentadas.

Considerando que o número de publicações referentes aos três tipos básicos de digestores de alta carga (UASB, filtros anaeróbios e reactores anaeróbios de leito fluidizado) reflecte a tendência geral da investigação no domínio tecnológico da digestão anaeróbia, apresenta-se na Figura 1.2 a evolução dessa tendência ao longo dos últimos 7 anos. Os valores são expressos em percentagem relativamente ao número total de publicações sobre anaerobiose.

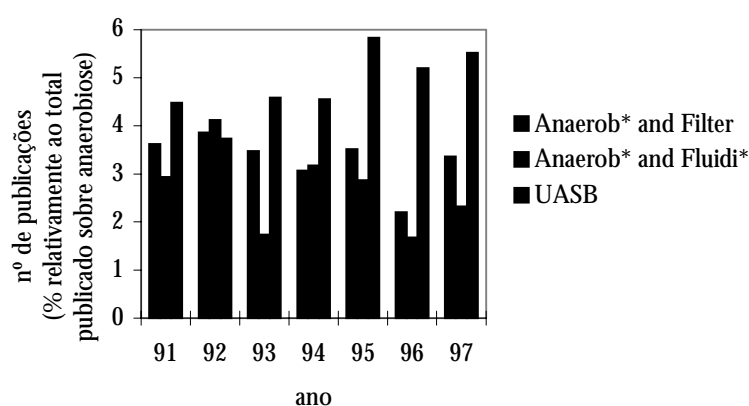


Figura 1.2 Evolução do número de publicações referentes a “UASB”, “ANAEROB* AND FILTER”, e “ANAEROB* AND FLUIDI*” (% do total publicado sobre anaerobiose).

Da análise desta figura verifica-se um crescente interesse científico pelos digestores de manto de lamelas do tipo UASB, relativamente aos outros tipos de digestores. De facto, o desenvolvimento deste tipo de digestor no início dos anos oitenta (LETTINGA *et al.*, 1980) originou um novo campo de investigação centrado no estudo da formação, estabilidade e caracterização dos agregados granulares de biomassa. A exploração científica que desde essa altura se iniciou sobre esse assunto, aliada ao excelente trabalho de publicidade e ao sucesso da aplicação desse tipo de digestor a nível industrial, mudou definitivamente o cenário da digestão anaeróbia, tal como pode ser avaliado no **sub-Capítulo** seguinte em que são apresentados dados recentes e evolutivos de aplicações da tecnologia anaeróbia. No entanto em algumas situações os sistemas de manto de lamelas podem não ser os mais adequados. Por exemplo, a aplicação a efluentes contendo lípidos é fortemente condicionada pela

formação de uma camada de ácidos gordos de cadeia longa envolvendo os agregados de biomassa. Os ácidos gordos de cadeia longa, além de serem altamente tóxicos para as bactérias envolvidas no processo, particularmente para as acetoclásticas (ALVES *et al.*, 1997 a), provocam a flutuação dos grânulos, conduzindo à lavagem das células (“*washout*”). RINZEMA (1988) estudou o tratamento anaeróbio de efluentes contendo ácidos gordos de cadeia longa e concluiu que o reactor do tipo UASB não era adequado, mas considerou viável a aplicação do reactor de leito expandido (EGSB). No entanto, mais recentemente Hwu (1997) concluiu que o tratamento de efluentes contendo ácidos gordos de cadeia longa não era compatível com as características operatórias do EGSB e tentativamente concluiu que a única forma de reter a biomassa no digestor era por recirculação dos agregados que se haviam tornado leves e floculentos. A aplicação de outros sistemas nomeadamente os de leito fixo a este tipo particular de efluente deve ser investigada, dado que os resultados obtidos com os sistemas de manto de lamas não se apresentam muito promissores. No **Capítulo 5** desta dissertação apresentam-se resultados sobre o efeito dos lípidos na retenção de biomassa em digestores de leito fixo, bem como dados relativos à toxicidade e biodegradabilidade do ácido oleico.

1.1.3 Aplicação prática da tecnologia de digestão anaeróbia

O crescente interesse científico nos processos de manto de lamas foi acompanhado pela também crescente aplicação deste sistema de tratamento a efluentes industriais. Leo Habets referiu, numa comunicação pessoal proferida na sede da *Society of Chemical Industry* em 1996, em Londres, que, até Junho desse ano, tinham sido inventariadas 914 unidades de tratamento anaeróbio de efluentes industriais, das quais 67% eram do tipo UASB e apenas 7% do tipo filtro anaeróbio. Segundo este autor, o número de unidades do tipo UASB instaladas desde 1981 cresceu de uma forma exponencial até 1994 estando actualmente em fase de estabilização devido ao desenvolvimento de outras tecnologias de manto de lamas mais eficientes tais como o reactor de recirculação interna (IC) (HABETS *et al.*, 1997), com aplicações em crescimento exponencial desde 1993.

Recentemente, HULSHOFF POL *et al.* (1997) apresentaram um projecto do “Deutsch Gesellschaft fur Technische Zusammenarbeit (GTZ)” intitulado “promoção da tecnologia

anaeróbia para o tratamento de efluentes industriais e municipais”. Este projecto, com duração de dois anos a partir de Outubro de 1995, teve como objectivo para o primeiro ano obter informação sobre a aplicação da tecnologia anaeróbia em vários países e desenvolver uma base de dados incluindo digestores, instituições envolvidas e literatura. No segundo ano do projecto seriam monitorizadas algumas instalações de biogás previamente seleccionadas, seriam compilados dados de operação de um grande número de unidades actualmente em operação e, com base na informação recolhida, seria elaborada uma matriz de decisão para selecção da tecnologia mais apropriada a aplicar em situações reais. Neste projecto foram inventariadas 1066 instalações de tratamento anaeróbio de efluentes, das quais 89.7% (956 unidades) são aplicações a tratamento de efluentes industriais, 7.3% (78 unidades) aplicadas ao tratamento de efluentes domésticos e 3% (32 unidades) aplicadas ao tratamento de resíduos sólidos orgânicos. A distribuição das unidades aplicadas ao tratamento de efluentes industriais, pelos vários tipos de digestores está representada na Figura 1.3 e representa aproximadamente a mesma distribuição indicada por Habets em 1996.

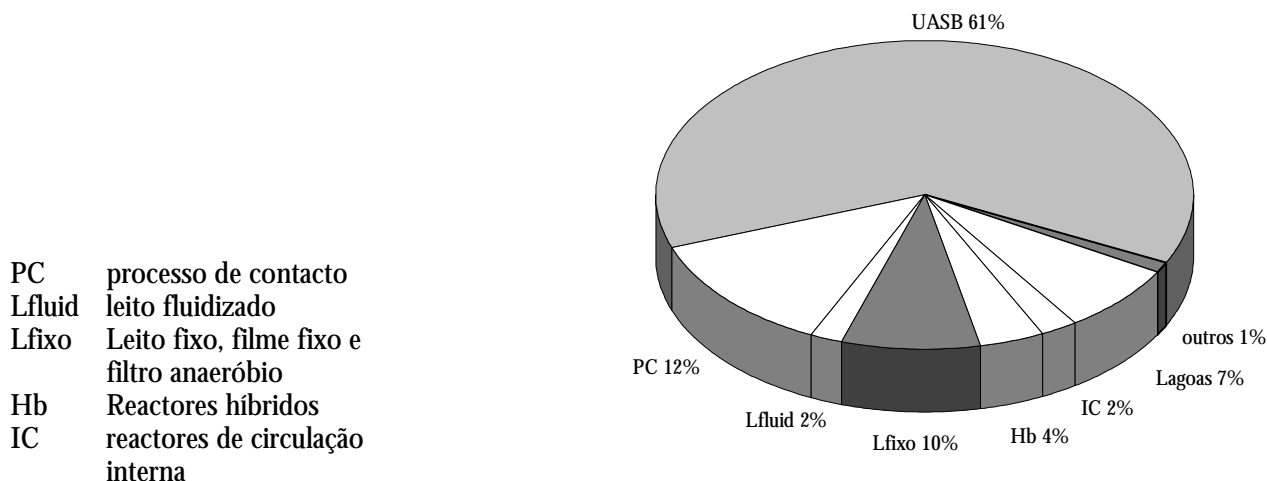


Figura 1.3 Aplicação da tecnologia anaeróbia ao tratamento de efluentes industriais. Distribuição por tipo de digestor. (adaptado de HULSHOFF POL *et al.*, 1997).

Neste inventário estão excluídas as pequenas instalações de biogás para tratamento de excreções de animais, que existem em elevado número por todo o mundo. Por exemplo, na Colômbia, foram instalados vários milhares de filtros anaeróbios de pequeno volume (HULSHOFF POL *et al.*, 1997) e na China rural existem mais de 5 milhões de pequenas unidades,

havendo indicação de que neste país, têm sido feitos esforços desde 1990 no desenvolvimento de instalações em média e grande escala, existindo actualmente mais de 600 instalações construídas, com uma capacidade total de 220 000 m³ (AN-RONG *et al.*, 1997).

É relativamente fácil encontrar informação actualizada sobre a aplicação da digestão anaeróbia nalguns países. Na Tabela 1.1 estão registados alguns dados sobre a aplicação da digestão anaeróbia nalguns em países em vias de desenvolvimento.

Tabela 1.1 Implantação da digestão anaeróbia nalguns países em desenvolvimento. Os dados excluem tratamento de resíduos sólidos orgânicos e pequenas unidades comunitárias.
Adaptado de HULSHOFF POL *et al.* (1997).

País	Habit. (x10 ⁶) (*)	TRATAMENTO DE EFLUENTES DOMÉSTICOS			TRATAMENTO DE EFLUENTES INDUSTRIAIS		
		nº de reactores (**)	Volume total instalado (m ³)	Volume instalado por habitante (m ³ /10 ⁵ habitantes)	nº de reactores (**)	Capacidade total de tratamento (tonCQO/dia)	Capacidade de tratamento por habitante (tonCQO/10 ⁵ habitantes.dia)
Brasil	155	14 (1)	2492	1.6	55 (2)	605	0.39
Colômbia	31.8	3 (1)	10900	34.3	13 (5)	145	0.46-
Equador	10	5	6267	62.7	-	-	-
México	88.6	28(***)	92150	<u>104.0</u>	40	638	0.72
China	1070	8	23640	2.2	25 (3)	168	0.02
Índia	880	18 (2)	60175	6.8	73 (7)	<u>3412</u>	0.39
Malásia	17.3	-	-	-	10	52	0.30
Nepal	19.1	-	-	-	1	50	0.26
Tailândia	55.7	-	-	-	30 (7)	840	<u>1.51</u>
Vietname	64.4	-	-	-	2	16	0.02

(*) dados de 1993;

(**) número entre parêntesis representa o número de reactores que não foi considerado nos cálculos por falta de dados operatórios;

(***) inclui o maior sistema de tratamento anaeróbio do mundo com um volume total de 83 700 m³, situado em Ixtaczoquitlan, Veracruz, que trata uma mistura de efluente doméstico e industrial.

A digestão anaeróbia está mais difundida na América Latina do que no Sudeste Asiático, embora haja variações regionais. No Brasil, México e Colômbia, a aplicação é bastante significativa assim como na Tailândia, Índia e China. Relativamente aos efluentes domésticos, a aplicação mais importante é no México, estimando-se que cerca de 2.3% dos efluentes domésticos desse país sejam tratados anaerobiamente, enquanto que em todos os outros países referidos na Tabela 1.1, esse valor se situa em menos de 1%. Na Tailândia há uma relevante aplicação em efluentes industriais, mas são exclusivamente agro-alimentares (HULSHOFF POL *et al.*, 1997).

É interessante verificar a evolução da aplicação da tecnologia anaeróbia no México nos últimos dez anos. Na Figura 1.4 está representado o número total de digestores instalados desde 1987, para tratamento de efluentes domésticos e industriais. A tendência de estabilização não se deve à saturação do mercado, mas sim à crise económica que se tem vivido nesse país desde 1992 (MONROY *et al.*, 1997). O tipo de digestor mais aplicado é o UASB com 73.3 % das unidades e 69.3 % do volume total instalado. O filtro anaeróbio representa 5.3% das unidades com apenas 0.4% do volume total instalado.

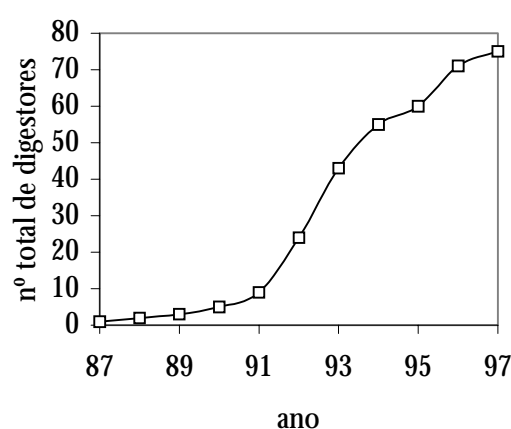


Figura 1.4 Evolução da aplicação da tecnologia anaeróbia no México, nos últimos dez anos.
(Adaptado de MONROY *et al.*, 1997).

Para comparação com os dados da Tabela 1.1, apresentam-se na Tabela 1.2 dados relativos a alguns países industrializados.

Não há, nestes países, aplicações ao tratamento de efluentes domésticos e, relativamente ao tratamento de efluentes industriais, verifica-se que a Holanda e a Bélgica são os países pioneiros a nível mundial, com 6.02 e 4.56 ton de CQO tratadas por dia e por habitante, respectivamente. No Japão, entre 1986 e 1996, construíram-se 129 digestores anaeróbios para tratamento de efluentes industriais, dos quais 93 foram UASB e 36 do tipo Filtro Anaeróbio, sendo relevante não ter sido construído nenhum digestor convencional de mistura completa. Destes digestores, 46% tratam efluentes de indústrias alimentares, 20%

de cervejeiras, 8% de refinarias de açúcar e a instalação na indústria química tem vindo a aumentar, estando presentemente em funcionamento 10 unidades (MIKAMI *et al.*, 1997).

Tabela 1.2 Implantação da digestão anaeróbia nalguns países industrializados. Os dados excluem tratamento de resíduos sólidos orgânicos e pequenas unidades comunitárias (HULSHOFF POL *et al.* 1997).

País	Habit. (x10 ⁶) (*)	<u>TRATAMENTO DE EFLUENTES DOMÉSTICOS</u>			<u>TRATAMENTO DE EFLUENTES INDUSTRIAIS</u>		
		nº de reactores (**)	Volume total instalado (m ³)	Volume instalado por habitante (m ³ /10 ⁵ habitantes)	nº de reactores (**)	Capacidade total de tratamento (ton.CQO/dia)	Capacidade de tratamento por habitante (tonCQO/10 ⁵ habitantes.dia)
Bélgica	9.9	-	-	-	36 (1)	452	4.56
França	56.66	-	-	-	49 (2)	643	1.14
Alemanha	79.1	-	-	-	79 (19)	884	1.12
Japão	123.5	-	-	-	158 (9)	823	0.67
Holanda	14.9	-	-	-	86 (2)	898	6.02

LETTINGA (1995) referiu-se à atitude negativa dos Estados Unidos da América relativamente à adopção dos processos de tratamento anaeróbio e justificou essa relutância com os interesses económicos estabelecidos em redor dos processos convencionais.

Estima-se que na Europa existam cerca de 2500 digestores anaeróbios para tratar lamas e cerca de 400 aplicados ao tratamento de efluentes industriais, sendo processado anualmente 1 bilião de toneladas de resíduos (WHEATLEY *et al.*, 1997). Na Tabela 1.3 está representada a distribuição das aplicações ao tratamento de efluentes industriais na Europa, por tipo de indústria. Estes números são semelhantes aos referidos por HABETS em 1996 (comunicação pessoal) para a distribuição da digestão anaeróbia por tipo de indústrias a nível mundial. Segundo este autor, num total de 914 unidades, 38% eram utilizadas para o tratamento de efluentes de indústrias alimentares, 25% para o tratamento de efluentes de cervejeiras, 15% para o tratamento de efluentes de destilarias, 9% para o tratamento de efluentes de papeleiras e 6% para o tratamento de efluentes da indústria química, sendo os restantes 7% aplicados ao tratamento de outros tipos, não descritos, de efluentes industriais.

Relativamente ao tipo de digestores implantados na Europa para o tratamento de efluentes industriais, verifica-se que a maior parte é do tipo UASB com 41% do número total de unidades, seguindo-se o filtro anaeróbio com 22%, o processo de contacto com

15% e o sistema de mistura completa sem reciclagem com 12%, sendo 10% constituídos por outros sistemas de tratamento (WHEATLEY *et al.*, 1997).

Tabela 1.3 Aplicações industriais da digestão anaeróbia na Europa^(*).

<u>Indústrias alimentares</u>		<u>Indústrias não alimentares</u>	
tipo de indústria	número de digestores (% do total)	tipo de indústria	número de digestores (% do total)
destilarias	16.4	produção de papel	14.5
refinarias de açúcar	15.4	farmacêutica	2.1
processamento de batata	12.1	química	1.5
indústria cervejeira	9.7	têxtil	0.6
refinarias de amido	7.6		
lacticínios	4.8		
matadouros	4.2		
fermento de padeiro	3.3		
enlatados	3.3		
processamento de frutas	2.7		
refrigerantes	1.5		

(*) dados baseados num total de 330 digestores.

Em Portugal não há dados actualizados sobre a implantação da digestão anaeróbia a nível industrial. Embora se saiba da existência de algumas unidades para o tratamento de efluentes da indústria cervejeira e de lacticínios, no relatório elaborado por NYNS (1994) surgem apenas duas unidades aplicadas ao tratamento de efluentes industriais. Existem além disso aplicações no sector agro-pecuário que foram inventariadas por OLIVEIRA MARQUES E DI BERARDINO (1991) sendo o tipo de digestor essencialmente de mistura completa. Referem outros processos que à data estavam em construção, do tipo “*plug flow*”.

1.2 Objectivos deste trabalho

Este trabalho teve como objectivo geral o estudo de digestores anaeróbios de leito fixo aplicados ao tratamento de efluentes lácteos sintéticos e cumpriu os objectivos que a seguir se descrevem:

(I) Comparação entre um filtro anaeróbio segmentado em três andares com remoção de biogás e um não segmentado, avaliando o efeito da segmentação nos seguintes parâmetros:

- eficiência de remoção e estabilidade operacional
- características físicas e microbiológicas da biomassa desenvolvida
- condições hidrodinâmicas
- efeito da alimentação múltipla lateral no filtro anaeróbio segmentado.

(II) Desenvolvimento de uma metodologia para estudar interacções entre a biomassa e o suporte em filtros anaeróbios, podendo ser aplicada para comparar e seleccionar suportes ou para estudar evolutivamente o crescimento da biomassa.

(III) Avaliação do efeito dos lípidos e de um ácido gordo de cadeia longa no desenvolvimento da biomassa em filtros anaeróbios, utilizando a metodologia previamente desenvolvida em II. Seguiram-se evolutivamente os seguintes parâmetros:

- quantidade total e distribuição da biomassa no suporte
- actividade de diferentes grupos tróficos do consórcio microbiano anaeróbio
- resistência à toxicidade do ácido oleico (ácido gordo de cadeia longa escolhido como modelo) sobre as bactérias metanogénicas acetoclásticas
- capacidade de biodegradação do ácido oleico

1.3 Estrutura e organização da tese

Na Figura 1.5 está representada esquematicamente a organização desta dissertação.

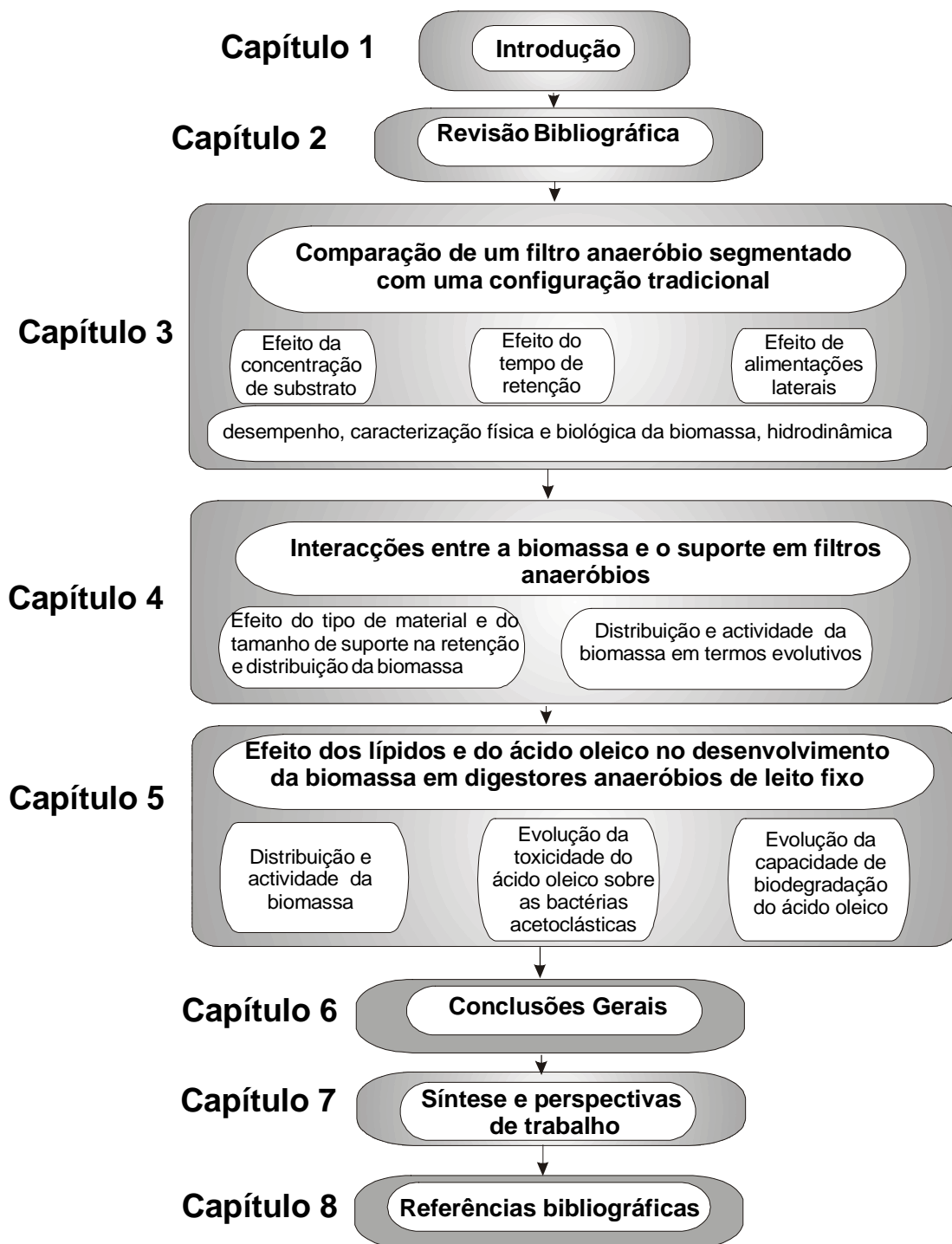


Figura 1.5 Esquema da organização desta dissertação.

2. Revisão Bibliográfica

Sumário

São descritas as principais transformações bioquímicas que ocorrem no processo de degradação anaeróbia, referem-se as necessidades nutricionais das bactérias metanogénicas e é avaliada a influência das condições ambientais, tais como pH, a temperatura e a presença de inibidores. São descritos alguns tipos de digestores anaeróbios, com especial ênfase para o digestor anaeróbio de leito fixo (filtro anaeróbio), sendo apresentados e comparados dados de operação de unidades à escala laboratorial e industrial. São enumeradas e comparadas metodologias de caracterização de digestores anaeróbios, com especial ênfase para a caracterização da biomassa.

Índice

2.1	O PROCESSO DE DEGRADAÇÃO ANAERÓBIA	43
2.2	APLICAÇÕES TECNOLÓGICAS DO PROCESSO DE DIGESTÃO ANAERÓBIA AO TRATAMENTO DE EFLUENTES LÍQUIDOS	66
2.3	PROCESSOS DE LEITO FIXO	71
2.4	METODOLOGIAS DE ESTUDO E CARACTERIZAÇÃO DE DIGESTORES ANAERÓBIOS	82

2.1 O processo de degradação anaeróbia

2.1.1 Microbiologia e bioquímica: evolução numa perspectiva histórica

A digestão anaeróbia é um processo microbiológico que, em condições de ausência de oxigénio, permite transformar a matéria orgânica em metano, ocorrendo em diversos meios naturais tais como sedimentos, fontes termais e sistemas gastrointestinais, e em ambientes controlados como é o caso dos digestores anaeróbios (CAIRÓ E PARIS, 1988).

ZEHNDER *et al.* (1982) descreveram, numa perspectiva histórica, os factos que mais contribuíram para o avanço do conhecimento da microbiologia do processo até essa data. Segundo estes autores, o conhecimento da existência do metano remonta a 1776, ano em que VOLTA o descobriu e lhe chamou “ar inflamável”. Desde essa data, passou-se cerca de um século até se provar que a metanogénese era um processo relacionado com a actividade microbiológica. BÉCHAMP (1868), isolou um “organismo” capaz de transformar etanol em metano e mostrou ainda que, dependendo do tipo de substrato, este “organismo” formava diferentes produtos, o que evidenciava que se tratava de uma cultura mista. POPOFF, em 1875, identificou o metano, o dióxido de carbono e o hidrogénio como produtos da degradação da celulose e HOPPE-SEYLER (1876) concluiu que o acetato, em condições anaeróbias, era convertido em quantidades iguais de metano e dióxido de carbono. No início deste século OMELIANSKI (1904) tentou, fracassadamente, separar os organismos produtores de hidrogénio dos produtores de metano. Mais tarde, este autor (OMELIANSKI, 1916) confirmou os resultados de BÉCHAMP que indicavam que, a partir de etanol, se formava metano. Na mesma altura, SÖHNGEN (1906) obteve culturas enriquecidas de duas bactérias metanogénicas acetofílicas, uma sarcina e uma filamentosa que surgia em feixes, e identificou o formato e a mistura de hidrogénio e dióxido de carbono como precursores do metano. ZEHNDER *et al.* (1982), consideram que as descobertas de SÖHNGEN foram as mais importantes até ao final dos anos trinta em que BARKER (1936) trabalhou com culturas enriquecidas de bactérias metanogénicas, tendo obtido uma cultura que se assemelhava à descrita por OMELIANSKI, a que deu o nome de *Methanobacillus omelianski* (WOLFE, 1971). O seu trabalho está documentado em artigos de revisão escritos por ele e seus colaboradores (BARKER, 1956,

STADTMAN, 1967). Em 1947 foram pela primeira vez isoladas duas bactérias metanogénicas em cultura pura, nomeadamente *Methanosarcina barkeri* e *Methanobacterium formicicum* (SCHNELLEN, 1947) e onze anos mais tarde, SMITH E HUNGATE (1958) aplicaram com sucesso a técnica de HUNGATE e isolaram *Methanobacterium ruminantium*. Esta técnica (HUNGATE, 1969) continua a ser utilizada actualmente, embora com modificações (MILLER E WOLIN, 1974), para a manipulação de microorganismos em condições anaeróbias estritas. Foi aplicando esta técnica, e trabalhando com a cultura que BARKER tinha obtido e mantido durante cerca de trinta anos no seu laboratório, que BRYANT *et al.* (1967) descobriram que a conversão de etanol a metano pelo “organismo” então denominado de *Methanobacillus omelianski* era possível porque esse “organismo” era, de facto, uma cultura mista constituída por uma bactéria não metanogénica que consumia o etanol e produzia hidrogénio e acetato e por uma bactéria metanogénica que consumia o hidrogénio e produzia metano. Associações microbianas deste tipo, em que um microorganismo produtor de um metabolito cresce apenas na presença de outro, consumidor desse metabolito, chamam-se associações sintróficas, (do grego: *Syn* – junto + *Trophein* - alimento). Esta descoberta alterou profundamente o conhecimento da metanogénese, reduziu o espectro dos possíveis precursores do metano que se resumiram a acetato, hidrogénio + dióxido de carbono, metanol e formato e abriu novas perspectivas de investigação na microbiologia do processo.

No início dos anos oitenta, HUSER *et al.* (1982) isolaram pela primeira vez uma bactéria com característica únicas, que era capaz de transformar acetato em metano e dióxido de carbono, mas incapaz de utilizar qualquer outro dos substratos então identificados como precursores do metano especialmente hidrogénio + dióxido de carbono e chamaram-lhe *Methanothrix soehngenii*. Este género de bactérias filamentosas ganhou especial interesse por ter um papel importante na formação dos agregados granulares de biomassa e por ter uma elevada afinidade para o acetato. Desde então foram isoladas outras espécies de *Methanothrix* (PATEL, 1984, NOZHEVNIKOVA E CHUDINA, 1985). Recentemente, PATEL E SPROTT (1990) renomearam o género *Methanothrix* como *Methanosaeta*, por não estar de acordo com o código internacional de nomenclatura das bactérias.

Nas últimas décadas foram publicados vários trabalhos de revisão sobre as bactérias metanogénicas, muitos deles emergentes da equipa de HUNGATE (WOLFE, 1971, ZEIKUS, 1977, BALCH *et al.*, 1979, OREMLAND, 1988, WOLFE, 1992).

2.1.2 Microbiologia e bioquímica: etapas do processo

Segundo HENZE E HARREMÖES (1983) a bioquímica e a microbiologia do processo de degradação anaeróbia são muito mais complexas do que as do processo aeróbio, devido à maior variedade de caminhos metabólicos disponíveis para a comunidade anaeróbia. De facto, a degradação anaeróbia da matéria orgânica a metano e dióxido de carbono, envolve uma cadeia sequencial de percursos metabólicos e requer a acção combinada e coordenada de diferentes grupos tróficos de bactérias anaeróbias (ZEIKUS, 1980). Inicialmente considerado um processo em duas fases, acidogénese e metanogénese, (McCARTY, 1964), tem-se revelado crescente em complexidade e, actualmente, é possível distinguir pelo menos 7 etapas, assinaladas no esquema da Figura 2.1:

1. Hidrólise de biopolímeros incluindo proteínas, hidratos de carbono e lípidos que são convertidos nos seus monómeros, respectivamente aminoácidos, açúcares e ácidos gordos de cadeia longa;
2. Fermentação de aminoácidos e açúcares;
3. Oxidação anaeróbia dos ácidos gordos de cadeia longa;
4. Oxidação anaeróbia dos produtos intermediários (ácidos voláteis, com excepção do acetato) a acetato e Hidrogénio;
5. Homoacetogénese
6. Conversão de acetato a metano pelas bactérias acetoclásticas;
7. Conversão do hidrogénio a metano pelas bactérias hidrogenotróficas.

Estas 7 etapas podem ser agrupadas em 4 sequências de degradação principais, assinaladas na Figura 2.1 (hidrólise, fermentação, acetogénese e metanogénese), e que se descrevem seguidamente.

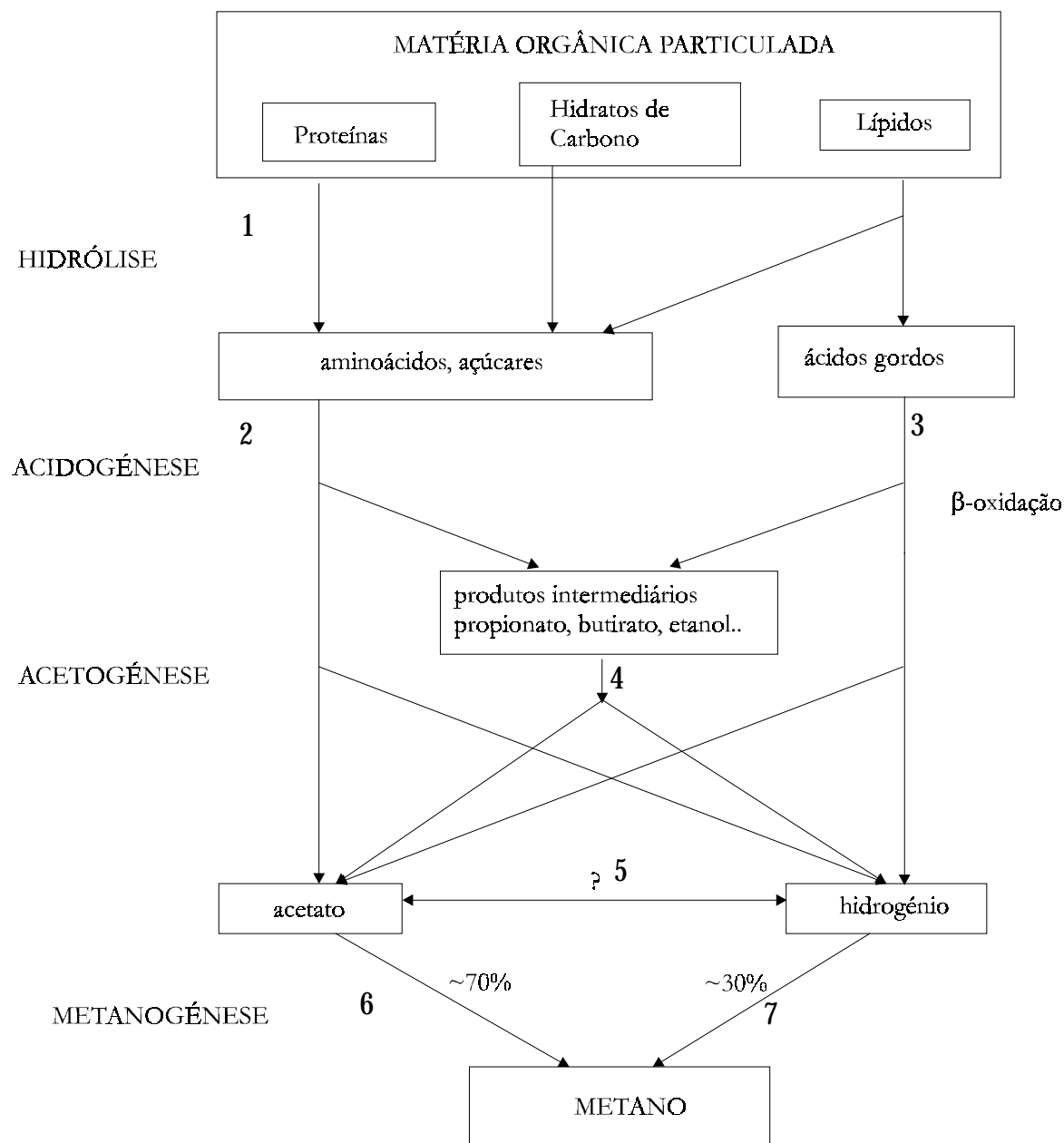


Figura 2.1 Esquema do processo de digestão anaeróbia (adaptado de GUJER E ZEHNDER, 1983). Os valores expressos em %, indicam fluxo de substrato na forma de CQO ou equivalente em metano.

2.1.2.1 Hidrólise

O primeiro passo da degradação anaeróbia, consiste na hidrólise ou liquefação dos biopolímeros, por meio de enzimas extracelulares, dado que as bactérias não têm capacidade para assimilar material orgânico na forma particulada. É normalmente um processo lento,

sendo os lípidos, no caso geral, hidrolisados mais lentamente, que as outras macromoléculas (HENZE E HARREMÕES, 1983).

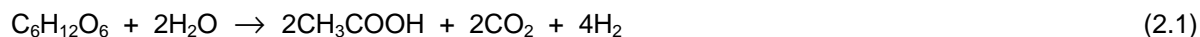
A velocidade da hidrólise é afectada por um grande número de factores, entre os quais a superfície específica e varia com o tipo de substrato (EASTMAN E FERGUSON, 1981). Embora no caso de um substrato complexo e heterogéneo a cinética de hidrólise possa ser considerada de 1ª ordem, outras cinéticas podem descrever mais adequadamente a hidrólise de substratos simples e homogéneos (GUJER E ZEHNDER, 1983, EASTMAN E FERGUSON, 1981, VALENTINI *et al.*, 1997). No caso de substratos complexos esta etapa pode limitar a velocidade do processo de degradação anaeróbia (PARKIN E OWEN, 1986).

2.1.2.2 Fermentação

Tal como indicado no esquema da Figura 2.1, os substratos utilizados no processo fermentativo, são os monómeros resultantes da hidrólise que, após serem transportados através da membrana celular para o interior da célula, são transformados numa variedade de produtos entre os quais acetato, propionato e butirato.

No geral, a população fermentativa representa cerca de 90% da população bacteriana total dos digestores anaeróbios (ZEIKUS, 1980). O número e a diversidade das espécies bacterianas fermentativas envolvidas no processo depende largamente da composição do substrato e o comportamento da fase acidogénica afecta a metanogénese (BRITZ *et al.*, 1994). Estudos microbiológicos da população fermentativa (ou acidogénica) em digestores anaeróbios, mostraram que a maioria das bactérias fermentativas são anaeróbias obrigatórias sendo algumas anaeróbias facultativas, tais como *Streptococci* e *Enterococcaceae* (MAH E SUSSMAN, 1968). Estas últimas permitem manter o potencial redox do meio em níveis baixos, consumindo o oxigénio que eventualmente possa entrar no digestor, dissolvido no efluente a tratar. WOLIN (1974) observou que o hidrogénio tem um papel preponderante na distribuição dos produtos desta fase do processo. Quando a pressão parcial de hidrogénio é inferior a 10^{-4} atm forma-se preferencialmente acetato e hidrogénio, segundo a reacção (2.1), sendo este o percurso metabólico mais rentável em termos energéticos (MOSEY E FERNANDES, 1984).

No caso da degração da glucose, por exemplo, a estequiometria é



obtendo-se 4 moles de ATP por mole de glucose transformada. Se a pressão parcial de hidrogénio na fase gasosa exceder 10^{-4} atm, são possíveis duas respostas, no sentido de contrariar o aumento da concentração de hidrogénio:

- produção de butirato, formando apenas 2 moles de hidrogénio / mole de glucose



- produção de propionato, consumindo 2 moles de hidrogénio / mole de glucose



Verifica-se que, em digestores em condições de desequilíbrio provocadas por sobrecargas orgânicas ou hidráulicas, a concentração de hidrogénio aumenta significativamente, acompanhada da acumulação de propionato (BARREDO E EVISON, 1991, RIEDEL E BRITZ, 1993). Recentemente INANC *et al.* (1996) apresentaram resultados que contrariaram a ideia estabelecida de que o propionato se acumulava como consequência da acumulação de hidrogénio, tendo concluído que a pressão parcial de hidrogénio não tinha efeito na acumulação de propionato. Segundo estes autores, a acumulação deste intermediário durante os períodos de instabilidade resulta de uma alteração da população acidogénica dominante. ZOETEMEYER *et al.* (1982) estudaram a acidificação da glucose num tanque agitado, em condições anaeróbias e concluíram que para determinadas concentrações de glucose se observava inibição pelos produtos (ácidos) formados. A razão entre a concentração de propionato e acetato foi proposta por MARCHAIM E KRAUSE (1993) como indicador da instabilidade em digestores anaeróbios.

As bactérias fermentativas têm tempos de duplicação curtos (MOSEY, 1983), verificando-se que a fermentação nunca é limitante no processo global da degradação anaeróbia (GUJER E ZEHNDER, 1983).

2.1.2.3 Acetogénese

A etapa da acetogénese consiste na transformação dos produtos da fermentação em acetato, dióxido de carbono e hidrogénio por acção das chamadas bactérias sintróficas ou produtoras obrigatórias de hidrogénio (OHPA - *obligate hydrogen producing acetogens*). Em

condições normais estas transformações são termodinamicamente desfavoráveis (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 Exemplo de algumas transformações acetogénicas (DOLFING, 1988).

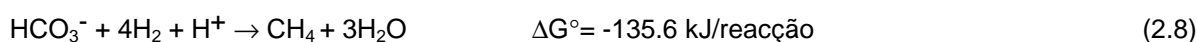
	ΔG° [kJ/reacção]	
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^- + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{CH}_3\text{COO}^- + 2\text{H}_2 + \text{H}^+$	+48.1	(2.4)
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + 3\text{H}_2 + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$	+74.0	(2.5)
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + 2\text{H}_2 + \text{H}^+$	+ 9.6	(2.6)

No entanto, as condições normais não são as que prevalecem em digestores anaeróbios. Assim o valor actual de ΔG deve ser calculado em vez de ΔG° . No caso da degradação do propionato a acetato, ΔG obtém-se pela equação (2.7).

$$\Delta G = \Delta G^0 + 2.3RT \log \frac{[\text{CH}_3\text{COO}^-] \times [\text{HCO}_3^-] \times [\text{H}_2]^3}{[\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^-]} \quad (2.7)$$

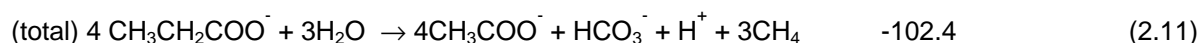
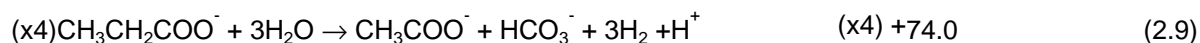
Considerando que as concentrações de propionato e acetato são iguais e que a concentração de bicarbonato é constante, o único factor variável é a concentração de hidrogénio (ZEHNDER E STUMM, 1988). Verifica que só se a concentração de hidrogénio for 10^{-4} atm ou menor, a oxidação do propionato se torna exergónica. Tal como para a degradação do propionato, as outras transformações acetogénicas produtoras de hidrogénio só são possíveis se a pressão parcial de hidrogénio no meio for da ordem de 10^{-4} atm.

Normalmente tal é assegurado pelas bactérias metanogénicas hidrogenotróficas ou, no caso de existir sulfato no meio, pelas bactérias sulfato-redutoras, por meio de um processo vulgarmente designado de “transferência de hidrogénio inter-espécies” (DOLFING, 1988). As bactérias metanogénicas, que têm uma elevada afinidade para o hidrogénio transformam-no juntamente com o dióxido de carbono, em metano, de acordo com a seguinte estequiometria (DOLFING, 1988):



A associação da reacção (2.8) com cada uma das transformações acetogénicas da Tabela 2.1 (equações (2.4) a (2.6)), permite torná-las termodinamicamente favoráveis. Seja, mais uma vez, o caso do propionato:

ΔG° , (kJ/reacção)



Uma vez que a conversão de acetato a metano tem uma energia livre de Gibbs negativa, o balanço global da degradação do propionato a metano torna-se, deste modo, termodinamicamente favorável.

A degradação de propionato em digestores anaeróbios tem sido estudada extensivamente (THOLOZAN *et al.*, 1988, MAWSON *et al.*, 1991, LENS *et al.*, 1996). Estes estudos demonstraram que além da oxidação sintrófica do propionato a H_2 e acetato, podem ser obtidos outros produtos da degradação do propionato tais como álcoois e ácidos voláteis de cadeia mais longa, com 4 a 7 átomos de carbono (LENS *et al.*, 1996). Em geral, estas reacções estão associadas com uma operação de digestores anaeróbios em condições sub-óptimas, mas não está esclarecido o seu papel na remoção da matéria orgânica.

Embora a existência das associações sintróficas dificulte o isolamento das bactérias produtoras de hidrogénio em cultura pura, BOONE E BRYANT (1980) identificaram *Syntrophobacter wolinii* que degrada propionato a acetato, dióxido de carbono e hidrogénio, em co-cultura com uma bactéria sulfato-redutora do género *Desulfovibrio* e MCINERNEY *et al.* (1981) demonstraram a conversão de butirato e outros ácidos até 8 átomos de carbono por *Syntrophomonas wolfei* em co-cultura com bactérias metanogénicas hidrogenotróficas e sulfato-redutoras.

Mais recentemente, STAMS *et al.* (1993) verificaram que, quando as bactérias metanogénicas de uma co-cultura sintrófica eram inibidas com a adição de bromoetanosulfonato (BES), o fumarato permitia substituir as bactérias metanogénicas como aceitador aparente de

electrões na degradação do propionato. A escolha do fumarato deveu-se a terem identificado que na degradação de propionato a acetato o passo energeticamente mais desfavorável era a conversão de succinato a fumarato. Observaram ainda que as bactérias que cresciam em fumarato eram obtidas numa cultura microscopicamente pura que degradava o propionato, quando era adicionado fumarato ou quando era adicionada uma cultura pura de *Methanospirillum hungatii*, que é uma bactéria metanogénica hidrogenotrófica.

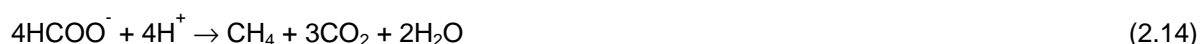
As espécies sintróficas também estão envolvidas na β -oxidação dos ácidos gordos de cadeia longa. *Syntrophomonas sapovorans* foi a primeira espécie sintrófica identificada, capaz de oxidar ácidos gordos de cadeia longa com mais de 10 átomos de carbono (ROY *et al.*, 1986). ZINDER E KOCH (1984) identificaram a primeira cultura sintrófica termofílica, dependente da transferência de hidrogénio inter-espécies. Nesta cultura, que parece não ter paralelo em condições mesofílicas, um organismo transforma acetato em hidrogénio e dióxido de carbono e outro organismo (bactéria metanogénica hidrogenotrófica) utiliza o hidrogénio para reduzir o dióxido de carbono a metano.

Pensa-se que as associações sintróficas requerem também uma associação física dos dois tipos de bactérias envolvidas. GUJER E ZEHNDER (1983), determinaram a distância máxima possível entre os dois tipos de bactérias para que a transferência do hidrogénio entre as duas espécies possa ocorrer e SCHINK E THAUER (1988) referiram que, de facto, a cooperação entre os dois grupos tróficos é optima quando a distância entre eles for mínima o que, segundo estes autores, pode justificar em parte o fenómeno da granulação. Talvez devido a este facto, num biofilme formado por uma população mista de bactérias anaeróbias mediu-se uma maior actividade em propionato e em butirato do que na mesma cultura não aderida a qualquer suporte (ALVES *et al.*, 1997 c). DOLFING (1992) referiu que a existência de gradientes de hidrogénio entre as bactérias produtoras e as consumidoras deste intermediário tem consequências energéticas para os microorganismos envolvidos.

LI *et al.* (1994) fizeram uma revisão das várias associações sintróficas identificadas e documentadas até essa data.

2.1.2.4 Metanogénese

A metanogénese é a etapa final do processo, responsável directa pela produção de metano e constitui, em muitos casos, o passo controlante do processo (LAWRENCE, 1971). As bactérias metanogénicas pertencem ao reino das *Arqueobactérias*, sendo agrupadas actualmente em três ordens, 7 famílias e 21 géneros. Foram identificadas mais de 65 espécies (WOESE *et al.*, 1990). Estas bactérias são anaeróbias estritas, requerendo para o seu desenvolvimento um potencial redox entre -250 e -300 mv. Possuem coenzimas e cofactores específicos (coenzima F420, F430, coenzima M, Metanopterina e Metanofurano (WOLFE, 1992)) e degradam apenas um número limitado de substratos com baixo número de carbonos: acetato, metanol, metilaminas, formato, e hidrogénio + dióxido de carbono. As equações 2.12 a 2.15 traduzem algumas das transformações que ocorrem nesta etapa:



No esquema da Figura 2.1 pode observar-se que, no processo de degradação anaeróbia, a maior parte do metano (70%) provém do acetato (JERIS E MCCARTY, 1965) pelo que esta conversão se reveste de particular importância. Acresce que as bactérias metanogénicas que degradam o acetato a metano representam o elo mais fraco de toda a cadeia de degradação anaeróbia no que respeita à sua resistência a condições adversas tais como choques orgânicos e hidráulicos e presença de substâncias tóxicas (COLLERAN, comunicação pessoal, 1996).

Nesta dissertação, as bactérias que degradam o acetato a metano segundo a reacção 2.13, serão designadas por acetoclásticas.

Até à data apenas foram identificados dois géneros como sendo acetoclásticos: *Methanosaeta* (ex. *Methanothrix*) e *Methanosarcina*, sendo conhecidas pelo menos cinco espécies acetoclásticas: *Methanosarcina barkeri*, *Methanosarcina TM-1*, *Methanococcus mazei*, *Methanosarcina acetivorans* e *Methanosaeta sp* (OREMLAND, 1988). Estes dois géneros de bactérias possuem

morfologias muito distintas; *Methanosaeta* surge em filamentos podendo estes ser curtos e dispersos ou longos e agregados em feixes (KAMAGATA E MIKAMI, 1990) e *Methanosarcina* cresce em agregados de cocos. Em termos cinéticos *Methanosaeta* apresenta maior afinidade para o acetato ($K_s=0.46$ mM) do que *Methanosarcina* ($K_s=3-5$ mM), mas cresce mais lentamente que *Methanosarcina* (GUJER E ZENHDER, 1983). Por exemplo *Methanosarcina barkeri* e *Methanosarcina mazei* têm tempos de duplicação de aproximadamente 24 horas enquanto que a filamentosa *Methanosaeta* tem tempos de duplicação de 3.5 a 9 dias (HUSER *et al.*, 1982).

De entre os géneros de bactérias metanogénicas conhecidos, *Methanosarcina* é o mais versátil metabolicamente podendo utilizar H_2/CO_2 , metanol, metilaminas, e acetato (MAH *et al.*, 1981), enquanto que o género *Methanosaeta* é exclusivamente acetotrófico (ZEHNDER *et al.*, 1980; HUSER *et al.*, 1982). *Methanosarcina barkeri* prefere metabolizar H_2/CO_2 , metanol e trimetilaminas em vez de acetato e pode apresentar um crescimento diáuxico quando lhe são fornecidos vários substratos à escolha.

Segundo a classificação de BALCH *et al.*, (1979), baseada na estrutura do RNA ribossómico 16S, existem vários géneros de bactérias metanogénicas que convertem hidrogénio e dióxido de carbono em metano: *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter*, *Methanothermus*, *Methanococcus*, *Methanomicrobium*, *Methanogénium*, *Methanospirillum*, *Methanosarcina*, *Methanoplanus*. As bactérias hidrogenotróficas controlam o potencial redox do meio, mantendo a concentração de hidrogénio em níveis baixos, condicionando o processo de acetogénese. Algumas espécies, tais como *Methanobacterium thermoautotrophicum* ou *Methanobrevibacter arboriphilicus* crescem apenas em H_2/CO_2 o que lhes confere características de autotróficas (COATES, 1991).

A metanogénese a partir do metanol está bem descrita (VOGELS *et al.*, 1988, FLORÊNCIO *et al.*, 1997). Em 1988 e segundo VOGELS *et al.* (1988) conheciam-se 11 espécies de bactérias metanogénicas que degradam o metanol, embora todos os estudos laboratoriais da metanogénese a partir do metanol tenham sido efectuados com *Methanosarcina barkeri*. O metanol pode ser convertido directamente em metano, mas também pode ser convertido em acetato pelas bactérias acetogénicas, se não houver limitação de carbono inorgânico, ou em H_2/CO_2 . Esta transformação, embora termodinamicamente desfavorável pode ser possível por associação sintrófica com bactérias metanogénicas hidrogenotróficas (DISTEFANO

et al., 1992, FLORÊNCIO *et al.*, 1997). Em digestores anaeróbios tenta-se maximizar a conversão directa de metanol a metano relativamente às transformações acetogénicas dado que a estas está associada uma menor remoção de carência química de oxigénio (CQO) (FLORÊNCIO *et al.*, 1997).

O formato é utilizado por cerca de metade das espécies metanogénicas conhecidas. O crescimento em formato fornece aproximadamente a mesma quantidade de energia que o crescimento em H_2/CO_2 (VOGELS *et al.*, 1988).

Existem várias revisões bibliográficas sobre a bioquímica, os aspectos energéticos e a microbiologia da metanogénese (DANIELS *et al.*, 1984, KELTJENS E VAN DER DRIFT 1986, WOLFE, 1992, FERRY, 1992, JONES *et al.*, 1987).

2.1.2.5 Outras transformações

Homoacetogénese

O metabolismo homoacetogénico foi descoberto por FONTAINE (1942) que observou a formação de acetato a partir de glucose e pela redução do dióxido de carbono. De facto, as bactérias homoacetogénicas podem crescer em H_2/CO_2 , mas também crescem heterotroficamente em alguns substratos orgânicos. O acetato é o principal produto, embora também possam produzir outros ácidos voláteis em menor quantidade (GOLDBERG E COONEY, 1981). Na Tabela 2.2 estão representadas algumas reacções homoacetogénicas.

Tabela 2.2 Exemplo de algumas transformações homoacetogénicas (LI *et al.*, 1994).

	ΔG° [kJ/reacção]	
$4CO + 2H_2O \rightarrow CH_3COO^- + H^+ + CO_2$	-166	(2.16)
$4H_2 + 2HCO_3^- + H^+ \rightarrow CH_3COO^- + 4H_2O$	-105	(2.17)
$4CH_3OH + 2HCO_3^- \rightarrow 3CH_3COO^- + 3H^+ + 4H_2O$	-219	(2.18)
$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 3CH_3COO^- + 3H^+$	-313	(2.19)

Embora existam em níveis de 10^5 - 10^6 /mL (OHWAKI E HUNGATE, 1977), o papel desempenhado pelas bactérias homoacetogénicas no processo de digestão anaeróbia não

está plenamente esclarecido e é normalmente subestimado. De acordo com ZEIKUS, (1980), as bactérias homoacetogénicas ajudam a manter uma baixa pressão parcial de hidrogénio nos digestores anaeróbios. Estas bactérias consomem hidrogénio tal como as metanogénicas hidrogenotróficas, sendo a competição entre estes dois grupos de bactérias hipoteticamente possível. No entanto, dado que as hidrogenotróficas possuem uma maior afinidade para o hidrogénio do que as homoacetogénicas, essa competição não é considerada importante para os baixos valores de hidrogénio que normalmente existem nos digestores anaeróbios (KATINKA, 1994). Por exemplo, MACKIE E BRYANT (1981) demonstraram que a formação de acetato a partir de H_2/CO_2 representava menos de 2% do acetato total sintetizado durante a digestão anaeróbia mesofílica de excrementos de bovinos. Também LOVLEY E KLUG (1983) observaram que o consumo de hidrogénio pelas bactérias homoacetogénicas representava menos de 5% do consumo total de hidrogénio devido às homoacetogénicas e metanogénicas hidrogenotróficas.

As bactérias metanogénicas hidrogenotróficas também ganham mais energia pela conversão de hidrogénio do que as homoacetogénicas. A uma pressão parcial de hidrogénio de 10^{-4} atm, uma pressão parcial de metano de 0.5 atm, 100mM de bicarbonato e 10 mM de acetato, a energia livre de Gibbs é de $\Delta G = -175.6$ kJ/reacção enquanto que para a transformação homoacetogénica é de $\Delta G = -117.6$ kJ/reacção (DOLFING, 1988).

A capacidade das bactérias homoacetogénicas utilizarem uma grande variedade de substratos pode ser um factor determinante da sua presença em digestores anaeróbios e em outros ecossistemas anaeróbios (ZEHNDER E STUMM, 1988).

Síntese de ácidos orgânicos

Em determinadas condições, nomeadamente na presença de excesso de etanol e de hidrogénio, algumas reacções acetogénicas podem ser revertidas por um número limitado de bactérias capazes de utilizar o dióxido de carbono como aceitador de electrões. Estas bactérias produzem ácidos de cadeia mais longa a partir de compostos com dois átomos de carbono, por reacções de elongação. A formação de butirato a partir de acetato ou de etanol por *Clostridium kluyveri* é um exemplo (BARKER, 1937). Mais recentemente foi isolada uma

bactéria que converte acetato e etanol em propionato (LAANBROEK *et al.*, 1982). A importância ecológica deste grupo de bactérias não foi ainda estudada em detalhe (SCHINK, 1988).

2.1.2.6 O papel dos protozoários

As bactérias metanogénicas podem manter uma relação de simbiose com ciliados anaeróbios, com base na transferência de hidrogénio inter-espécies (DOLFING, 1988). Nestas relações de simbiose as bactérias metanogénicas foram inicialmente identificadas pela sua auto-fluorescência a 420 nm tendo sido posteriormente isoladas em cultura pura (VAN BRUGGEN *et al.*, 1984, 1986).

Verificou-se que bactérias metanogénicas hidrogenotróficas se mantinham activas nas proximidades dos organelos do tipo hidrogenossomas - organelos que produzem CO₂, H₂ e acetato - em *Metopus striatus* (VAN BRUGGEN *et al.*, 1983). A análise das sequências de RNA 16S permitiu verificar que algumas espécies de metanogénicas em simbiose, embora morfologicamente semelhantes, eram diferentes das espécies “livres” (BRUL E STUMM, 1994). FENCHEL E FINLAY (1991) referem que provavelmente a vantagem do protozoário hospedeiro nestas relações simbióticas é o mais rápido crescimento na presença das metanogénicas e a manutenção de uma baixa pressão parcial de hidrogénio.

O papel dos protozoários nos sistemas aeróbios de lamas activadas tem sido largamente estudado (MADONI E GHETTI, 1981, ESTEBAN *et al.*, 1991, SALVADÓ E GARCIA, 1993). Embora neste trabalho tenham sido observadas associações entre bactérias metanogénicas e protozoários, não foram encontradas referências bibliográficas com paralelismos entre o papel dos protozoários nos sistemas aeróbios de tratamento de efluentes e nos anaeróbios.

2.1.3 Necessidades nutricionais das bactérias metanogénicas

Dado que a metanogénese é normalmente a etapa limitante do processo de degradação anaeróbia é fundamental satisfazer os requisitos nutricionais deste grupo trófico, de modo a assegurar a eficiência e a estabilidade operacionais. Os microorganismos necessitam de todos os ingredientes essenciais para o crescimento, nomeadamente macro e micro-nutrientes (SPEECE, 1983). Se houver limitação de nutrientes, o crescimento é deficiente, embora tenha sido demonstrado que, mesmo nessas condições, pode ocorrer uma

significativa redução da carga poluente, o que pode ser interessante na perspectiva da redução da produção de biomassa (LETTINGA, 1995).

2.1.3.1 Macronutrientes

Embora fosse admitido até 1984 que todas as metanogénicas requeriam o ião amónio como fonte de azoto, foi demonstrado que várias espécies de metanogénicas tinham capacidade de fixar o azoto molecular, num processo energeticamente dispendioso para as células (BELAY *et al.*, 1984, LOBO E ZINDER, 1988). BOMAR *et al.* (1985) verificaram que o crescimento de *Methanosarcina barkeri* com azoto molecular em vez de ião amónio reduzia o rendimento em biomassa. Também podem ser usadas ureia e glutamina como fonte de azoto (BELAY *et al.*, 1984, BHATNAGER *et al.*, 1984), mas o ião amónio parece ser a fonte de azoto preferida pela bactérias metanogénicas e normalmente a sua adição faz aumentar a taxa de crescimento destas bactérias (KIRSOP, 1984).

SCHERER *et al.* (1983) concluíram que para uma população acetotrófica de *Metanosarcina*, a razão carbono:fósforo variava entre 16:1 e 75:1 (% em peso), o que corresponde a 9.5 mg P/gVSS. SPEECE E MCCARTY (1964) traduziram a composição elementar da biomassa pela fórmula empírica $C_5H_7O_2NP_{0.06}$, a que corresponde um teor de 10.5 mg P/mg VSS. ALPHENAAR (1994) verificou que o conteúdo em fósforo da biomassa granular presente num digestor de manto de lamas industrial variava entre 6.5 e 37 mg P/g VSS.

O enxofre é requerido pela maior parte das bactérias metanogénicas por ser um dos elementos presentes na coenzima M (ácido 2-mercaptoetanosulfónico), que está envolvida nas reacções metanogénicas (FERRY, 1992). SCHERER *et al.* (1983), obtiveram valores entre 0.56 e 1.2% (% em peso) para o conteúdo em enxofre de várias espécies de bactérias metanogénicas. MOUNTFORD E ASHER (1979) verificaram que para o crescimento das bactérias metanogénicas eram necessárias concentrações de 10 a 27 mg/L de sulfureto, embora seja tóxico para concentrações superiores a 100 mg/L na forma não ionizada (H_2S). O sulfureto também pode precipitar alguns metais essenciais tais como ferro, níquel e cobalto, reduzindo a sua disponibilidade no meio (SPEECE, 1983).

É sabida a necessidade de adicionar nutrientes a certos efluentes, de modo a obter uma eficiente remoção da matéria orgânica durante o seu tratamento anaeróbio. A adição da

quantidade correcta de nutrientes é importante porque minimiza os custos e evita problemas de eutrofização no meio receptor da corrente de saída do processo (BRODERICK E SHERRARD, 1985). A estimativa das necessidades em azoto, fósforo e enxofre pode ser obtida pela composição e pela taxa de crescimento da população bacteriana (LETTINGA, 1995).

HENZE E HARREMÕES (1983) referem razões CQO/N de 400/7 para sistemas a operar com cargas orgânicas mássicas elevadas (de 0.8 a 1.2 kgCQO/kg VSS.dia) e razões CQO/N bastante mais elevadas, da ordem de 1000/7, para sistemas a operar com cargas orgânicas inferiores a 0.5 kgCQO/kg VSS.dia. PAN VEIRA (1991) estudou o efeito da razão C/N/P no tratamento anaeróbio de um efluente de uma indústria de lacticínios, testando 3 reactores a operar com 3 relações diferentes para esses nutrientes: 240/7.5/1 - considerado o controlo, 240/7.5/0.2 e 240/1.5/1. Concluiu que a deficiência em azoto provocava a diminuição das actividades hidrolítica e acetoclástica em cerca de 50 a 60% relativamente ao controlo, mas que a deficiência em fósforo só diminuía essas actividades em 10 a 20%.

ALPHENAAR (1994) verificou que a deficiência em fósforo reduzia a actividade em 50% relativamente a um controlo, mas essa actividade era substancialmente recuperada pela adição de uma pequena concentração de fósforo (100 mg P-PO₄/L). Observou ainda que precipitados inorgânicos de fosfato podem funcionar como fonte interna de fósforo em digestores anaeróbios.

BRITZ *et al.* (1988) estudaram o efeito da diminuição da quantidade de nutrientes no tratamento anaeróbio de um efluente de uma indústria petroquímica, tendo concluído que o fósforo e o azoto podiam ser reduzidos desde 115 e 1060 mg/L até 8 e 45 mg/L respectivamente, mantendo a eficiência do sistema sempre superior a 95%.

2.1.3.2 Micronutrientes

SCHERER *et al.* (1983) determinaram a composição elementar de dez espécies de bactérias metanogénicas nos seguintes elementos: C, H, N, Na, K, S, P, Ca, Mg, Fe, Ni, Co, Mo, Zn, Cu e Mn. Na Tabela 2.3 estão representados os valores médios obtidos para 10 espécies de bactérias metanogénicas (SCHERER *et al.*, 1983, TAKASHIMA E SPEECE, 1990)

Tabela 2.3 Composição elemental média de bactérias metanogénicas
(SCHERER *et al.*, 1983, TAKASHIMA E SPEECE, 1990)

elemento	µg/g (peso seco)
C	370000-440000
H	55000-65000
N	95000-128000
P	5000-28000
S	5600-12000
Na	3000-40000
K	1300-50000
Ca	1000-4500
Mg	900-530
Fe	700-2800
Ni	65-180
Co	10-120
Zn	50-630
Mo	10-70
Cu	<10-160
Mn	5-25

Com base nos valores desta tabela e sabendo as características médias de crescimento de uma dada população é possível estimar as necessidades nutricionais destas bactérias (LETTINGA, 1995). TAKASHIMA E SPEECE (1989) verificaram que entre estes elementos, Fe, Ni e Co eram essenciais para obter uma elevada conversão de acetato em metano. A função fisiológica do ferro parece ser semelhante à que este metal tem nas bactérias comuns, nomeadamente como fonte de electrões, estando envolvido no metabolismo na forma de citocromos e ferredoxina. SPEECE E PARKIN (1983) observaram uma redução dos níveis de ácidos voláteis na corrente de saída de um digestor de 4000 mg/L para 400 mg/L, 10 dias após a adição de 50 mg/L de FeCl₃. RAJU *et al.* (1991) observaram o efeito estimulatório do ferro em concentrações até 4000 mg/L de FeCl₃.

O níquel é essencial para as bactérias metanogénicas por ser um dos constituintes do factor F₄₃₀ envolvido nos passos terminais das reacções metanogénicas. A detecção de níveis elevados de níquel na membrana celular, sugere que este metal pode estar envolvido na estabilidade estrutural tal como observado em *Methanobacterium bryantii* (JARREL E SPROTT, 1982). O cobalto está presente em moléculas (corrinoídes) envolvidas na actividade da metil transferase e desidrogenase (JARREL E SPROTT, 1982, TAKASHIMA E SPEECE, 1990). FLORÊNCIO *et al.* (1997) observaram que, de entre vários micronutrientes, o cobalto era o único que afectava a metanogénese a partir do metanol, estimulando os grupos tróficos que utilizam

directamente o metanol, isto é as bactérias metanogénicas metilotróficas e as acetogénicas. As metanogénicas hidrogenotróficas e acetoclásticas não foram significativamente afectadas pelo cobalto.

MURRAY E VAN DEN BERG (1981 a) também concluíram que a conversão de acetato a metano, num reactor de filme fixo era fortemente estimulada pela adição combinada de níquel e cobalto o que foi atribuído ao desenvolvimento de um biofilme mais espesso após a adição destes nutrientes.

TAKASHIMA E SPEECE (1990) tabelaram as concentrações estimulatórias de alguns micronutrientes (especialmente Fe, Ni e CO) para culturas enriquecidas em acetoclásticas e para consórcios desenvolvidos no tratamento de alguns efluentes industriais e MCCARTY (1964) definiu os índices de concentração de Na, K, Ca e Mg, que estimulam e que inibem o processo. Segundo este autor, as concentrações estimulatórias situam-se na gama de 75 a 400 mg/L, ocorrendo uma inibição moderada para concentrações de 1 a 5 g/L e uma inibição forte para concentrações entre 3 e 12 g/L, dependendo do metal.

GUIOT *et al.* (1988) referem a importância da adição de Ni, Co e Mo e LETTINGA *et al.* (1980) recomendam níveis de Ca de 80 a 200 mg/L para um eficiente processo de granulação, embora não relacionados com necessidades nutricionais.

2.1.4 Condições ambientais

2.1.4.1 pH e alcalinidade

Dado que o pH afecta a taxa de crescimento dos microorganismos, variações de pH podem causar importantes alterações na constituição microbiana dos consórcios. O pH afecta o metabolismo, nomeadamente a utilização das fontes de carbono e energia, as reacções de síntese e a produção de metabolitos extracelulares (SAKHAROVA E RABOTNOVA, 1976). Além disso, a morfologia e a estrutura são também afectadas, com consequências para os fenómenos de adesão e floculação (FORAGE *et al.*, 1985), aspectos de crucial importância nos digestores anaeróbios.

Uma vez que o processo de digestão anaeróbia é uma sequência de degradações levadas a cabo por grupos distintos de bactérias, é importante saber qual o pH que maximiza a

eficiência global do processo. Os diferentes grupos bacterianos apresentam actividade máxima para valores de pH não muito diferentes (LEMA E MENDEZ, 1988). Segundo estes autores pH entre 7 e 7.4 é óptimo para as bactérias hidrolíticas e acetogénicas e pH 6 é óptimo para as bactérias fermentativas. As bactérias metanogénicas, normalmente responsáveis pela cinética global do processo e mais sensíveis a factores ambientais, apresentam um óptimo de pH entre 6.6 e 7.6 (ZEHNDER, 1980), considerando-se normalmente esta gama de pH apropriada para o funcionamento do processo de digestão anaeróbia.

ATTAL *et al.* (1986) verificaram a existência de actividade metanogénica para valores baixos de pH (até 4.3) o que parece contrariar o facto de estas bactérias serem altamente sensíveis a variações de pH. Estes autores atribuíram o facto à possível existência de micro ambientes, nos quais o pH seria superior ao medido no meio.

A toxicidade do ião amónio (NH_4^+) é influenciada pelo pH do meio. Para valores elevados de pH forma-se preferencialmente a forma não ionizada (NH_3) que penetra na membrana celular (McCARTY, 1964). Também os ácidos voláteis e o H_2S exercem uma toxicidade influenciada pelo pH do meio traduzindo-se pelo deslocamento dos equilíbrios ácido-base destes compostos, no sentido das formas não ionizadas, para baixos valores de pH (SÄRNER, 1986, ANDREWS E GRAEF, 1971). As formas não ionizadas penetram na célula, dissociam-se e provocam o aumento da concentração intracelular de hidrogénio. A extrusão do excesso de protões consome ATP, diminuindo a sua disponibilidade para o crescimento e metabolismo (FUKUZAKI *et al.*, 1990).

A produção de ácidos voláteis como produtos intermediários neste processo, pode provocar uma descida acentuada do pH do meio, se não existir alcalinidade suficiente no sistema. A alcalinidade é uma medida da capacidade tampão do processo, permitindo antecipadamente determinar qual a tolerância em ácidos gordos voláteis para que o valor do pH se mantenha na gama pretendida, e está intimamente relacionada com a estabilidade do processo

Para a maioria dos casos práticos, uma alcalinidade entre 2500 e 5000 mg CaCO_3/L é suficiente para se obter um adequado poder tampão no sistema (GRADY E LIM, 1980).

2.1.4.2 Temperatura

A temperatura é também um dos factores que mais influencia a eficiência do processo de degradação anaeróbia. Normalmente são consideradas três gamas de temperatura: mesófila (20-45 °C), termófila (> 45 °C) e gama psicrófila (< 20 °C) (COATES, 1991). As bactérias metanogénicas apresentam um crescimento máximo na gama mesófila, para temperaturas entre 30 e 38 °C e na gama termófila entre 49 e 57 °C.

Recentemente, NOZEVNICHOVA *et al.* (1997) observaram a produção de metano em sedimentos de lagos profundos, a temperaturas entre 2 e 70 °C, tendo obtido uma cultura que apresentava um máximo de actividade metanogénica a temperaturas entre 4 e 8 °C, demonstrando, pela primeira vez, a existência de uma comunidade específica psicrófila. Verificaram que a adição de celulose, ácidos voláteis, metanol e H₂/CO₂ estimulava a produção de metano a todas as temperaturas. H₂/CO₂ e metanol eram directamente convertidos em metano em condições termofílicas, mas, em condições psicrófilas, estes substratos eram convertidos em metano em dois passos, formando-se inicialmente acetato que era posteriormente convertido em metano. Observaram ainda que, para concentrações elevadas de acetato, a metanogénese acetoclástica era inibida a baixas temperaturas.

VAN LIER *et al.* (1997) obtiveram eficiências de remoção de CQO solúvel de 97% aplicando cargas orgânicas entre 5.1 e 6.7 kg CQO/m³.dia com um tempo de retenção hidráulico de 4 horas e a uma temperatura de operação de 8 °C, num digestor do tipo EGSB com dois andares.

SAKINOJA-SALONEN *et al.* (1983) referiram que, embora a operação a baixas temperaturas seja possível, a fase de arranque pode ser um processo problemático. HENZE E HARREMÕES (1983) referem que o arranque deve ser efectuado a 35 °C, com posterior diminuição gradual da temperatura desde esse valor até à temperatura de operação desejada, à taxa de 1 °C por dia, de modo a favorecer a adaptação dos microorganismos. No entanto, LETTINGA (comunicação pessoal, 1996) referiu que no arranque de um processo termofílico deve ser, se possível, usado um inóculo termofílico.

VAN LIER *et al.* (1994) referiu a importância do tratamento anaeróbio termofílico especialmente para efluentes produzidos a altas temperaturas como por exemplo, os de destilarias e de produção de papel e pasta de papel. Salientou a vantagem de usar um processo termofílico segmentado em vários andares para melhorar a retenção de biomassa e diminuir a concentração de ácidos voláteis na corrente de saída do reactor, relativamente a processos termofílicos de um só andar.

VIRARAGHAVAN E KIKKERI, (1990) compararam a operação de três filtros anaeróbios a várias temperaturas (12.5, 21 e 30 °C) e constataram que, mantendo todas as outras condições constantes, o reactor que funcionava a temperatura mais baixa, apresentava maior sensibilidade a variações no tempo de retenção e menor eficiência de remoção para um dado tempo de retenção.

Tal como em digestores mesofílicos, também nos termofílicos o acetato é o responsável pela produção de cerca de 2/3 do metano. Estirpes termófilas de *Methanosarcina* e *Methanosaeta* (*Methanotherix*) foram isoladas e revelaram-se semelhantes às homólogas mesófilas, excepto nas taxas específicas de crescimento que são cerca de 2 a 4 vezes superiores, o que pode justificar as maiores taxas de remoção e a possibilidade de operar com menores tempos de retenção em digestores termófilos (ZINDER, 1988).

No entanto, AHRING (1995) observou que num digestor termófilo quando a concentração de acetato é menor que 1 mM este metabolito não é directamente transformado em metano mas sim *via* H₂/CO₂ num processo em duas etapas realizado por uma associação sintrófica de bactérias baseada na transferência de hidrogénio, e originalmente descrito por ZINDER E KOCH (1984). Segundo AHRING (1995), esta cultura sintrófica que surge em condições termófilas, tem um papel equivalente à *Methanosaeta* (ex *Methanotherix*) que domina os digestores mesófilos quando a concentração de acetato é baixa.

HENZE E HARREMÕES (1983) referem que a temperaturas elevadas, a lise celular ocorre rapidamente, e além do tempo necessário para o arranque dos processos ser, em geral, elevado, há maior sensibilidade a variações na carga orgânica ou à presença de tóxicos, tornando o processo instável (PARKIN E OWEN, 1986). Por exemplo HWU (1997), observou que em condições termofílicas o oleato de sódio apresentava uma taxa de degradação superior à

observada em condições mesofílicas, mas o índice de toxicidade relativamente à actividade acetoclástica (IC_{50}) era substancialmente menor a temperaturas elevadas (0.35-0.79 mM a 55 °C e 2.35-4.30 mM a 30 °C), tornando difícil a escolha entre os dois processos.

HAWKES *et al.* (1995) descreveram o efeito dum choque térmico a 55 °C num filtro anaeróbio mesofílico à escala piloto. Os ácidos voláteis à saída do digestor aumentaram significativamente e a remoção de CQO baixou de 60-70% para 10%.

2.1.4.3 Inibidores da metanogénese

As bactérias metanogénicas são particularmente susceptíveis a uma larga gama de componentes. No entanto, segundo LETTINGA (1995), a situação é bem menos dramática do que era suposto no passado, e tem-se tornado claro que muitos dos compostos tradicionalmente referidos como inibidores, podem ser efectivamente biodegradados por um consórcio anaeróbio adaptado. A biomassa estruturada em grânulos apresenta uma resposta à toxicidade diferente da biomassa dispersa. Por exemplo relativamente à toxicidade do oleato de sódio, cuja acção se exerce ao nível da parede celular, verificou-se que o índice de toxicidade aumentava com a diminuição da área específica da biomassa, o que significa uma maior resistência da biomassa granular do que da biomassa dispersa (HWU, 1997).

Alguns compostos como por exemplo clorofórmio, tetracloreto de carbono e compostos nitro-aromáticos, são persistentes à degradação aeróbia, mas, em condições anaeróbias são degradados a compostos menos tóxicos (por exemplo aminas aromáticas, 500 vezes menos tóxicas que os compostos nitro-aromáticos originais), mesmo sem uma prévia aclimatização do consórcio envolvido (VAN EEKERT *et al.*, 1995, RAZO-FLORES *et al.*, 1997), sendo estes intermediários posteriormente degradados em condições aeróbias. Por exemplo RAZO-FLORES *et al.*, 1997 verificaram que as aminas aromáticas que possuíam grupos carboxilo e hidroxilo eram completamente mineralizadas em condições anaeróbias, enquanto que as que não possuíam esses grupos, não eram mineralizadas pelo consórcio metanogénico, excepto se na presença de bactérias sulfato-redutoras ou desnitrificantes. No entanto, em condições aeróbias são degradadas, o que evidencia a importância da sequenciação de tratamento anaeróbio-aeróbio na mineralização deste tipo de compostos (FIELD *et al.*, 1995).

A tolerância ao oxigénio pelas bactérias metanogénicas é diferente de espécie para espécie, podendo mesmo variar de estirpe para estirpe, de acordo com as condições ambientais. Verificou-se por exemplo que células dispersas de *Methanosarcina barkeri* eram altamente sensíveis ao oxigénio, exibindo contudo alguma tolerância quando se encontravam agregadas, o que sugere que o fenómeno da agregação pode ter um efeito protector contra o oxigénio (KIENER E LEISINGER, 1983). Em efluentes pouco concentrados, o oxigénio pode atingir concentrações até 10 mg/L o que pode inibir as bactérias metanogénicas e provocar o crescimento de organismos aeróbios ou facultativos na superfície dos agregados granulares, deteriorando as suas características de sedimentação. No entanto, os resultados obtidos por KATO (1994) indicam que na prática não foi observado efeito adverso do oxigénio sobre a eficiência do sistema de tratamento. A protecção conseguida pelas bactérias metanogénicas no interior dos grânulos e a que lhes é conferida pelas bactérias facultativas que têm tempos de duplicação curtos e que consomem o oxigénio dissolvido, permite, segundo este autor o tratamento anaeróbio de efluentes diluídos.

Alguns metais, se em elevadas concentrações, podem ter um efeito adverso no processo de degradação anaeróbia. LIN (1992) estudou o efeito de vários metais (Cd, Cu, Cr, Zn, Pb, Ni) na actividade acetoclástica e sintrófica (em propionato e butirato) e concluiu que o Cádmio e o Cobre eram os metais mais tóxicos e que o Níquel e o Chumbo eram os menos tóxicos. As bactérias acetogénicas, consumidoras de propionato revelaram-se mais sensíveis ao Crómio e ao Zinco do que as acetoclásticas. Também HICKEY *et al.* (1989) referem que a inibição por metais pode afectar a produção de metano, sem implicar uma inibição directa da metanogénese, mas sim de outros grupos tróficos presentes no consórcio. De acordo com JACKSON-MOSS E DUNCAN (1989), o alumínio pode ser tolerado até concentrações de 2500 mg/L, embora concentrações superiores tenham efeito inibitório no processo. OLESKIEWICZ E SHARMA (1990) fizeram uma revisão sobre as concentrações estimulatórias e inibitórias dos metais pesados nos processos de tratamento anaeróbio de efluentes.

A descoberta de inibidores metabólicos específicos é uma ferramenta particularmente útil em estudos bioquímicos e ecológicos (OREMLAND, 1988). São conhecidas algumas substâncias que bloqueiam a formação de metano, sendo algumas destas substâncias inibidoras em

maior ou menor grau das outras bactérias anaeróbias. OREMLAND E CAPONE (1988) fizeram uma revisão sobre inibidores específicos. O uso do ácido 2-bromoetanosulfônico (BES) como inibidor específico das bactérias metanogénicas tem ganho popularidade. Este composto é um análogo estrutural da coenzima M, que se encontra exclusivamente nas bactérias metanogénicas (BALCH E WOLFE, 1979). Embora a susceptibilidade ao BES por parte das várias espécies de bactérias metanogénicas seja variável, ZINDER *et al.* (1984) referiram que concentrações da ordem de 0.05 M bloqueavam completamente a redução do CO₂ pelo H₂. O uso de uma concentração de 0.5 mM de BES por BECCARI *et al.* (1996) para inibir a metanogénese, foi contestado por HWU *et al.* (1996 a), por terem considerado essa concentração demasiado baixa. No entanto, os primeiros autores argumentaram que a ausência de metanogénese tinha sido comprovada pela ausência de metano no biogás, mesmo para concentrações de BES de 0.5 mM (BECCARI E MAJONE, 1997).

2.2 Aplicações tecnológicas do processo de digestão anaeróbia ao tratamento de efluentes líquidos

A primeira referência à aplicação do processo de digestão anaeróbia para o tratamento de resíduos data de 1860, num relato do francês LOUIS MOURAS que descreveu a liquefacção da matéria orgânica de um efluente doméstico em condições anaeróbias (FORSTER, 1994). DONALD CAMERON, de Exeter, em Inglaterra, modificou o tanque de LOUIS MOURAS e deu-lhe o nome de “tanque séptico”, e este sistema foi escolhido em 1897 pelo governo local, para o tratamento de todos os efluentes da cidade (BUSWELL E NEAVE, 1930).

FAIR E MOORE (1934) demonstraram que o aquecimento dos sistemas de tratamento resultava em duas gamas óptimas de temperatura, mesofílica e termofílica e, em meados dos anos cinquenta, foi introduzida a agitação mecânica o que melhorou substancialmente o contacto entre as bactérias e os resíduos a tratar (FINNEGAN, 1994). Este sistema é largamente utilizado para a estabilização das lamas produzidas nos sistemas aeróbios de tratamento de efluentes. A Oeste de Londres existe um sistema com 20 tanques agitados anaeróbios que estabilizam as lamas provenientes do tratamento de efluentes de uma população com 1.4

milhões de habitantes. A capacidade total instalada é de 70 000 m³ e são produzidos diariamente 58 000 m³ de biogás com um teor médio de metano de 65% (BUVET, 1986).

Nos digestores de mistura completa não há retenção de biomassa sendo o tempo de retenção hidráulico (TRH) igual ao tempo de retenção de sólidos (TRS) e da ordem dos 20 a 30 dias. Devido às baixas taxas de crescimento das bactérias anaeróbias a redução do tempo de retenção nestes sistemas aumenta o risco de “*washout*” da biomassa. Este problema é ultrapassado pela utilização dos sistemas com retenção de biomassa, em que a biomassa é mantida no interior do reactor, tornando-se o TRH independente do TRS. A distinção entre os vários processos de alta carga é fundamentalmente devida ao mecanismo de retenção de biomassa dentro do reactor que pode ocorrer, basicamente, segundo três formas distintas: granulação, recirculação ou adesão a suportes fixos ou móveis (IZA *et al.*, 1991).

Na Figura 2.2 estão representados alguns tipos de reactores que se consideram ser representativos das formas de bio-imobilização acima referidas, nomeadamente: reactor anaeróbio de manto de lamas de fluxo ascendente conhecido pelo acrónimo UASB ('Upflow Anaerobic Sludge Blanket'), digestor anaeróbio de leito expandido ou fluidizado e processo de contacto. Os processos de leito fixo, com especial relevância para o filtro anaeróbio de fluxo ascendente, são descritos no **sub-Capítulo 2.3** desta dissertação.

2.2.1 UASB

O UASB foi desenvolvido em finais dos anos setenta pela equipa de Gatzke Lettinga de Wageningen, Holanda e baseia-se na tendência que a biomassa tem para formar agregados densos que são mantidos no interior do reactor pelas suas características de sedimentação e com a ajuda de um separador gás-sólido-líquido (LETTINGA *et al.*, 1980).

Neste tipo de sistema, a biomassa constitui grânulos de tamanho variável, entre 0.1 e 8 mm (HICKEY *et al.*, 1991) e não está fixada sobre qualquer suporte. Como se pode verificar na Figura 2.2 (a), existem duas zonas distintas neste tipo de reactor: a zona inferior designada por leito de lamas, que tem uma concentração elevada de biomassa constituída em grânulos com elevada velocidade de sedimentação e a zona superior onde predominam flocos de pequeno tamanho e em que a concentração de biomassa é muito menor. O gás produzido e

alguma biomassa flutuante que existe na secção superior são separados da corrente líquida de saída por meio de um separador gás-sólido-líquido colocado no topo do digestor.

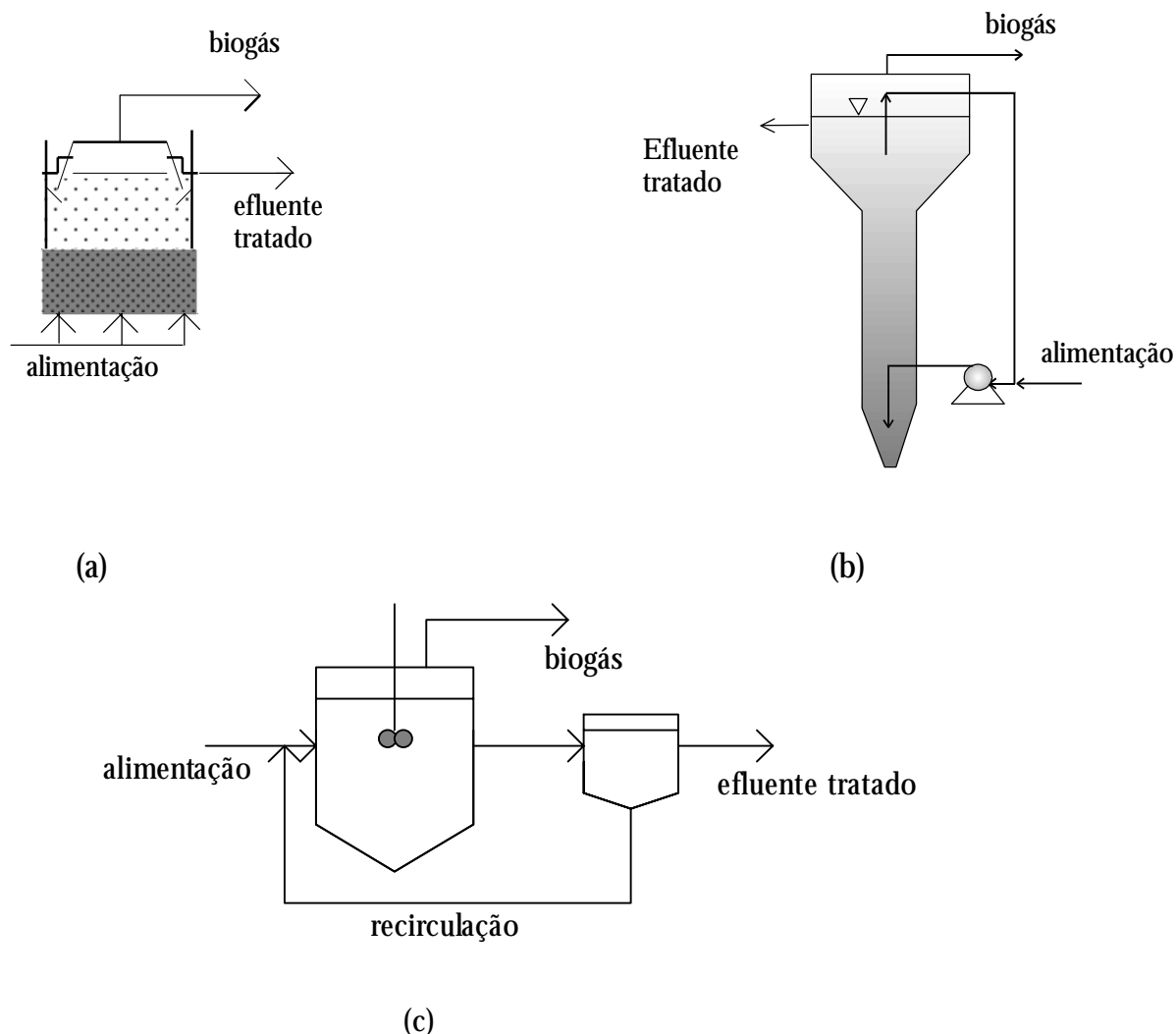


Figura 2.2 Esquemas simplificados de digestores com retenção de biomassa. (a) UASB. (b) Digestor anaeróbio de leito fluidizado. (c) Processo de contacto

A aplicação do reactor UASB ao tratamento de vários tipos de efluentes essencialmente solúveis tem sido demonstrada ao longo dos últimos anos (LETTINGA *et al.*, 1980, 1983, 1984, KATO, 1994, FLORÊNCIO *et al.*, 1997, RUIZ *et al.*, 1997) e a sua aplicação termofílica e psicrófila tem sido testada a nível laboratorial (VAN LIER *et al.*, 1994, VAN LIER *et al.*, 1997, DINSDALE *et al.*, 1997).

Têm sido desenvolvidos alguns desenhos de reactores baseados no UASB: o reactor de manto de lamas de leito expandido (EGSB - “*expanded granular sludge bed*”), que consiste num UASB com leito expandido por meio da recirculação do efluente, o reactor de recirculação interna (IC - “*Internal Circulation*”), que consiste em dois ou mais compartimentos do tipo UASB uns sobre os outros e em que o líquido e a biomassa recirculam internamente (HABETS *et al.*, 1997), o reactor com vários andares (VAN LIER *et al.*, 1994, GUIOT *et al.*, 1995) e o reactor horizontal segmentado com anteparos (GROBICKI E STUCKEY, 1991). Em todos estes sistemas, embora não estritamente necessária, é suposta a utilização de biomassa estruturada em grânulos.

A biomassa granular pode ser obtida a partir de biomassa dispersa com uma variedade de efluentes industriais. No entanto, HULSHOFF POL *et al.* (1983) referem que, para altas concentrações de ião amónio (> 1000 mg/L), não ocorreu granulação. HICKEY *et al.* (1991) citando COHEN (comunicação pessoal, 1989) referem que, para um efluente constituído por soro de queijo não ocorreu granulação, mas, uma vez inoculados, os grânulos podiam ser mantidos nesse tipo de substrato. Os efluentes contendo lípidos são particularmente problemáticos para a biomassa granular. Além dos problemas de toxicidade dos ácidos gordos de cadeia longa, resultantes da hidrólise dos lípidos, são referidos na literatura problemas de adsorção dos ácidos gordos na superfície dos grânulos, tornando-os leves, flutuantes e conduzindo ao “*washout*” (RINZEMA, 1988, HWU, 1997).

A fase de arranque deste tipo de reactor pode tornar-se um passo crítico, uma vez que não estão bem estudados os processos básicos da granulação, conhecendo-se apenas alguns factores que a estimulam (WEILAND E ROZZI, 1991, LETTINGA, 1995). Em regiões em que não há disponibilidade de inóculo granular (como por exemplo em Portugal), a instalação de uma unidade deste tipo requer um investimento inicial que comporta a compra e transporte desse inóculo, o que pode ser significativo. Além disso a ocorrência de deterioração granular nem sempre é previsível nem controlável, sendo um aspecto que tem merecido alguma atenção por parte dos investigadores nos últimos anos (FANG *et al.*, 1994, THAVEESRI *et al.*, 1994, ALPHENAAR, 1994).

2.2.2 Digestor anaeróbio de leito expandido ou fluidizado

Neste tipo de reactor a biomassa encontra-se fixa num suporte, estando o conjunto fluidizado ou apenas ligeiramente expandido. O suporte pode ser areia, vidro, carvão activado, ou outros materiais porosos (HEIJNEN, 1986 CHEN *et al.*, 1988 SWITZENBAUM E JEWELL, 1980). Devido à elevada velocidade de sedimentação das partículas, (cerca de 50 m/h), é necessário aplicar elevadas velocidades ascensionais (10 a 30 m/h), para conseguir a expansão do leito (HEIJNEN *et al.* 1986). Na prática isso é conseguido utilizando uma recirculação, tal como se indica na Figura 2.2 (b).

Podem ser referidas algumas das vantagens deste tipo de reactores (FENÁNDEZ-POLANCO E DIEZ, 1988; CHEN *et al.*, 1988):

- as concentrações de biomassa são normalmente elevadas, da ordem dos 30 a 40 g SSV/L,
- não há problemas de colmatção do leito,
- é possível o tratamento de efluentes pouco concentrados, devido à elevada velocidade de transferência de massa,
- as perdas de carga não são muito elevadas,
- a concentração de sólidos voláteis no efluente é normalmente baixa,
- pode ser utilizado no tratamento de resíduos tóxicos e compostos recalcitrantes, uma vez que o elevado caudal de reciclagem permite normalmente a obtenção de condições de mistura total, facultando a diluição desses compostos dentro do reactor.

HEIJNEN *et al.* (1986) refere as seguintes desvantagens para estes sistemas de tratamento:

- a formação do biofilme que recobre as partículas de suporte é um processo lento, implicando normalmente a necessidade de elevados tempos de arranque,
- é difícil o controlo da espessura do biofilme,
- o consumo energético é elevado, devido principalmente à necessidade de bombagem da corrente de recirculação,
- é difícil e dispendioso, conseguir distribuidores do líquido eficientes, em unidades à escala industrial.

HOLST *et al.* (1997) referem a instalação de 26 unidades à escala industrial entre 1986 e 1996 aplicadas essencialmente a indústrias agro-alimentares. Salientam que alguns desenhos de digestores anaeróbios de leito fluidizado, permitem aplicar cargas orgânicas mais elevadas ($> 60 \text{ kg CQO/m}^3\cdot\text{dia}$) do que o UASB, para o mesmo tipo de efluente e para os mesmos níveis de eficiência.

2.2.3 Processo de contacto

É um processo análogo ao tradicional sistema aeróbio de lamas activadas, sendo composto por um digestor do tipo CSTR e um decantador que provoca a separação e recirculação das lamas, permitindo assim uma elevada concentração de biomassa no digestor (Figura 2.2(c)). Muitas vezes existe um sistema de desgasificação entre as duas unidades, que proporciona uma decantação mais eficiente, melhorando o desempenho geral do sistema (PARIS *et al.*, 1983).

A agitação no digestor pode ser mecânica ou por meio de injeção do biogás, verificando-se que, em termos económicos, a agitação mecânica é 2 a 3 vezes menos dispendiosa; no entanto a agitação com biogás revela-se mais eficiente e permite reter maiores concentrações de biomassa no sistema (25 a 30 g ST/L) (NÄHLE, 1991).

2.3 Processos de leito fixo

2.3.1 Descrição

O digestor anaeróbio de leito fixo ou filtro anaeróbio consiste numa coluna contendo um enchimento de características muito variáveis, no interior do qual é possível reter grandes quantidades de biomassa, aderida na superfície do suporte, e oclusa nos vazios da matriz, podendo esta encontrar-se numa forma floculada ou granular (YOUNG, 1991). A direcção do fluxo pode ser ascendente ou descendente. Na Figura 2.3 está representado um esquema simplificado deste tipo de digestor, no caso do fluxo ser ascendente.

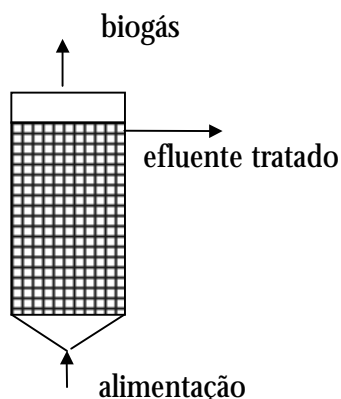


Figura 2.3 Esquema do filtro anaeróbio de fluxo ascendente

O processo de retenção de biomassa num leito fixo de suporte inerte, aplicado com sucesso por todo o mundo no tratamento aeróbio de efluentes, teve uma das suas primeiras aplicações anaeróbias registadas na Finlândia no tratamento do efluente dum tanque séptico (MAKKONEN, 1953). A par deste registo, existem na literatura referências à utilização do processo ainda no século passado e nos anos trinta (CALLANDER E BARFORD, 1983). No entanto, os créditos do desenvolvimento do conceito filtro anaeróbio vão para YOUNG E MCCARTY (1967), que pela primeira vez demonstraram o potencial de aplicação deste processo ao tratamento de vários tipos de efluentes, em gamas de concentração alargadas. Além de terem constatado a estabilidade operacional do processo, YOUNG E MCCARTY (1967) verificaram que o filtro anaeróbio suportava alterações bruscas no caudal ou na concentração do efluente até um factor de quatro vezes, desde que a alcalinidade no meio fosse suficiente e que após catorze dias sem alimentação o filtro anaeróbio recuperava a sua eficiência em quatro dias, sem recurso a nenhum procedimento especial de rearranque.

Segundo YOUNG (1983), o filtro anaeróbio pode tratar efluentes relativamente pouco concentrados (1000 a 10000 mg CQO/L) à temperatura ambiente, sem necessidade de recirculação de sólidos. Por ser um processo com retenção de biomassa, permite aplicar cargas orgânicas bastante superiores às aplicadas nos digestores anaeróbios de mistura completa. O tempo de retenção de sólidos é elevado e o efluente tratado apresenta geralmente baixos teores de sólidos. É um processo particularmente estável podendo sofrer choques orgânicos. Após semanas ou mesmo meses sem ser alimentado, o filtro anaeróbio pode restabelecer rapidamente a sua actividade. Associados ao filtro anaeróbio, referem-se normalmente problemas de colmatção do leito, dificuldade de contacto entre substrato e biomassa e limitações difusionais.

Foram propostas alternativas do modo operativo, por exemplo no que se refere à recirculação do efluente ou à direcção do fluxo de modo descendente (DEWALLE E CHIAN, 1976, VAN DEN BERG E KENNEDY, 1983). Desenvolveram-se ainda reactores do tipo híbrido, que podem ser considerados como uma fusão entre o filtro anaeróbio de fluxo ascendente e o digestor de manto de lamelas (UASB) (REYNOLDS E COLLIERAN, 1986).

2.3.2 Influência do tipo de suporte

O meio de suporte utilizado em filtros anaeróbios é, em geral, de características muito variadas, quer em termos dos materiais utilizados (pedras, tubos de PVC, esponja de poliuretano, argila expandida, anéis plásticos e enchimentos plásticos modulares) (YOUNG E MCCARTY, 1967, DAHAB E YOUNG, 1982, REYNOLDS, 1986, MARQUES, 1988, ALVES *et al.*, 1997 b), quer em termos da sua disposição no leito, podendo ser do tipo ordenado ou aleatório.

A tentativa de correlacionar a eficiência de remoção em filtros anaeróbios com características do suporte tais como porosidade, área superficial, tamanho de poro, forma e orientação do material no leito, conduziu a diversos estudos sistemáticos realizados pela equipa de JAMES YOUNG durante os anos oitenta (DAHAB E YOUNG, 1982, YOUNG E DAHAB, 1983, SONG E YOUNG, 1986).

YOUNG E DAHAB (1983) verificaram que o meio que retinha mais sólidos biológicos, aderidos e em suspensão (meio plástico modular 20x40 mm), não era o que conduzia à melhor eficiência do sistema (meio plástico modular 50x80 mm), o que está de acordo com o facto anteriormente verificado pelos mesmos autores de que o desempenho destes sistemas também não é directamente relacionado com a porosidade do meio (DAHAB E YOUNG, 1982). A área superficial também não tem um efeito dominante na eficiência de filtros anaeróbios de fluxo ascendente. SONG E YOUNG, 1986 concluíram que um aumento de 60% na superfície, apenas produziu um aumento de 2% na eficiência do processo. Estes autores concluíram ainda que a característica mais importante é a capacidade do meio redistribuir o fluxo dentro da matriz, permitindo um eficiente contacto entre o substrato e a biomassa contida no reactor.

Num filtro anaeróbio de fluxo ascendente a fracção de biomassa aderida é considerada desempenhar um papel secundário devido à sua baixa concentração relativamente à biomassa total acumulada. O tipo de suporte é determinante na distribuição entre as referidas formas de biomassa. DAHAB E YOUNG (1982) verificaram que num filtro anaeróbio de fluxo ascendente apenas 33 a 50% da biomassa se encontrava aderida em qualquer dos suportes que utilizaram (suportes plásticos e pedras). Contudo, REYNOLDS (1986), que operou dois filtros anaeróbios de fluxo ascendente, um com argila expandida e outro com um suporte de anéis plásticos, concluiu que no suporte de argila a maior parte da biomassa

(entre 50% e 80% da biomassa total, na base e no topo do digestor respectivamente) era retida na forma de biofilme, enquanto que no suporte plástico a biomassa aderida representava apenas 33% da biomassa total.

Apesar de ser geralmente considerada de menor importância relativamente à oclusão, a adesão proporciona uma imobilização mais estável. Quando sujeita a choques hidráulicos ou de tóxicos, esta forma de biomassa será mais resistente ao arrastamento pela corrente de saída do digestor e ao efeito dos tóxicos do que a fracção que se encontra dispersa nos vazios da matriz (oclusa) (SPEECE E PARKING, 1983). Além disso, se for necessário proceder a uma lavagem em contracorrente para evitar a colmatação do leito, a existência de um biofilme na superfície do suporte será determinante no rearranque do processo.

A utilização de suportes que favorecem a adesão diminui o período de arranque de filtros anaeróbios, tal como foi verificado por VAN DEN BERG E KENNEDY (1981) e por KENNEDY E DROSTE (1986). WILKIE (1984), por exemplo, demonstrou a superioridade da argila como suporte em filtros anaeróbios para tratamento de efluentes suínicos. MURRAY E VAN DEN BERG (1981 b) compararam o desenvolvimento do biofilme de uma cultura enriquecida em bactérias do género *Methanosaeta* (*ex Methanothrix*), sobre vários suportes (vidro, PVC e argila), e também concluíram que a argila era o material mais favorável, não só devido às características físicas da sua superfície, nomeadamente rugosidade e porosidade, mas também à presença de certos minerais, particularmente Ferro, que se sabe terem um efeito estimulatório na actividade metanogénica. No entanto, outros autores ao compararem a capacidade de colonização de vários suportes (PVC, argila vermelha, espuma de poliuretano reticulada e um resíduo mineral contendo níquel e sepiolite), em ensaios em reactor fechado, concluíram que a espuma de poliuretano e o PVC eram os materiais mais favoráveis para a colonização e que a argila inibia a formação do biofilme (BONASTRE E PARIS, 1988). Estes autores admitem, contudo, que a argila, por ser um material natural, pode apresentar características químicas muito diversas. Além disso, provavelmente, o efeito estimulatório ou inibitório de materiais de suporte é dependente do tipo de substrato utilizado.

ANDERSON *et al.* (1994) estudaram a operação de dois filtros anaeróbios, um com um suporte poroso e outro com um suporte não poroso, tendo concluído que no suporte

poroso o biofilme era mais espesso o que implicava maior estabilidade, maior resistência ao “washout” e maior capacidade de tratamento. Mais do que a porosidade interna, a existência de pequenas rugosidades com tamanho semelhante ao das células favorece a fixação dos microorganismos, protegendo-os dos efeitos da tensão de corte (HUYSMAN *et al.*, 1983, ALVES *et al.*, 1997c).

MAESTROJUAN E FIESTAS (1988), e MUÑOZ *et al.* (1994) referem a existência de interacções entre os materiais de suporte e as bactérias anaeróbias. MARSHALL E GOODMAN (1994) referem que as condições ambientais encontradas pelos microorganismos nas superfícies podem afectar a expressão de certos genes. O processo de adesão pode, portanto, alterar as características fisiológicas dos microorganismos, afectando a sua actividade. Por exemplo PAN VEIRA (1991) verificou que a actividade metanogénica específica da biomassa aderida era superior à da biomassa oclusa num filtro anaeróbio alimentado com um efluente lácteo. REYNOLDS (1986) determinou a actividade metanogénica da biomassa aderida e oclusa num filtro anaeróbio de fluxo ascendente pela medida da concentração intracelular do co-factor F_{420} . Concluiu que apenas cerca de 10% do F_{420} presente na base do rector se encontrava aderido, e que no topo do rector a fracção de F_{420} aderido aumentava para 80% do total medido.

Em biofilmes formados em suportes minerais, verificou-se que a adesão diminuiu a actividade metanogénica específica média da biomassa (medida relativamente a uma mistura de acetato, propionato e butirato). No entanto, analisando a degradação de cada ácido individualmente, foi verificado que só a actividade acetoclástica era afectada negativamente e que as actividades em propionato e em butirato eram estimuladas pelo processo de adesão (ALVES *et al.*, 1997 c). Este facto foi atribuído à existência no biofilme, e à semelhança do que se pensa acontecer na biomassa granular de um ambiente mais favorável do que na biomassa dispersa, para a transferência de hidrogénio inter-espécies que se sabe ser determinante na actividade das bactérias consumidoras de propionato e butirato (GUJER E ZEHNDER, 1983). Observou-se ainda que a actividade específica do biofilme diminuía linearmente com a espessura do mesmo, o que sugere o aumento de limitações difusionais com a espessura do biofilme (ALVES *et al.*, 1997 c).

A adesão de microorganismos a superfícies é fortemente influenciada pelas características físico-químicas da superfície, nomeadamente, hidrofobicidade, interacções electrostáticas,

rugosidade porosidade e tamanho de poros (MESSING E OPPERMAN, 1979, YEE, 1990, MOZES *et al.*, 1988, PETROZZI *et al.*, 1993). WANG E WANG (1988), baseados num modelo matemático simples, concluíram que num suporte poroso, a capacidade máxima de retenção de microorganismos ocorre quando a relação entre o tamanho dos poros e o das células se situa entre 2 e 5.

Uma característica importante que influencia e pode condicionar a fase inicial da adesão é a hidrofobicidade do material de suporte. Nem todas as bactérias metanogénicas têm a mesma tendência para aderir a determinadas superfícies. VERRIER *et al.* (1988), concluíram, utilizando materiais poliméricos com diferentes hidrofobicidades, e usando culturas puras de 4 bactérias metanogénicas, que a então designada *Methanothrix soehngenii* preferia superfícies hidrofóbicas, *Methanospirillum hungatei* preferia superfícies hidrofílicas, *Methanosarcina mazei* MC3 não tinha tendência para aderir a nenhum dos materiais testados e *Methanobrevibacter arboriphilicus* aderiu indiscriminadamente a todas as superfícies. Outros autores também verificaram que *Methanosarcina barkeri*, em cultura pura não aderiu, tendo, no entanto verificado que surgia em biofilmes formados a partir de culturas mistas, provavelmente por incorporação num biofilme pré-existente (MEIER-SCHNEIDERS *et al.*, 1993).

2.3.3 Estratégias de inoculação e início de operação

A fase de arranque dos reactores anaeróbios é em geral um processo lento que depende principalmente dos seguintes parâmetros (WEILAND, 1987):

- quantidade e qualidade do inóculo;
- grau de adaptação da cultura ao efluente;
- velocidade de crescimento dos microorganismos;
- grau de retenção da biomassa no reactor.

YOUNG E MCCARTY (1967), testaram diversas formas de inoculação de filtros anaeróbios, tendo concluído que o ideal para um rápido arranque dum reactor deste tipo, seria adicionar o inóculo directamente na zona inferior do filtro, sendo o volume de inóculo 1/3 do volume do reactor, e utilizar lamas densas que sejam arrastadas ao longo da coluna. No entanto como se pode avaliar da Tabela 2.4, têm sido utilizadas várias estratégias de arranque deste tipo de reactores.

Tabela 2.4 Estratégias de inoculação de filtros anaeróbios.

Substrato	Inóculo (% em volume)	Proveniência	Metodologia	Referência
efluente de indústria farmacêutica	60%	digestor anaeróbio de tratamento de lamas	substrato sintético alimentado após inoculação; substituição gradual pelo substrato em estudo	JENNET E DENNIS, 1975
efluente de processamento de melaço	30%	tanque Imhoff	adições intermitentes de substrato sintético (10 L/dia) durante 9 dias	CARRONDO <i>et al.</i> , 1982
efluente de suinicultura diluído	100%	digestor que tratou mesmo tipo de substrato	mistura de efluente e metanol, sendo este gradualmente diminuído; aumento da carga orgânica durante 72 dias	BONASTRE <i>et al.</i> , 1986
efluente da indústria farmacêutica	10%	digestor anaeróbio de tratamento de lamas (est. trat. municipal)	Recirculação total durante 2 dias	STRONACH, <i>et al.</i> , 1987
efluente de suinicultura	30%	obtido por sedimentação do efluente dum digestor tratando o mesmo tipo de substrato	5 semanas em sistema fechado sem adições; quando a produção de gás parou, recomeçou-se a alimentação	REYNOLDS E COLLIERAN, 1986
efluente doméstico	10%	digestor anaeróbio de tratamento de lamas (est. trat. municipal)	substrato alimentado continuamente sem recirculação	VIRARAGHAVAN <i>et al.</i> , 1989
efluente lácteo	—	digestor anaeróbio de tratamento de lamas (est. trat municipal)	inóculo alimentado com substrato diluído a 10%; aumento gradual da concentração de substrato durante 68 dias	VIRARAGHAVAN E KIKKERI, 1990
efluente lácteo	75 %	UASB tratando efluente de indústria açucareira	recirculação total durante 2 dias	PAN VEIRA, 1991
efluente de processamento do mexilhão	—	UASB tratando efluente de indústria açucareira	recirculação elevada durante o arranque	SOTO <i>et al.</i> , 1992
efluente de produção de levedura	50%	digestor anaeróbio de tratamento de efluentes de produção de levedura	30% do inóculo adicionado na zona inferior do filtro e 20% disperso na coluna	APOLINARSKI, 1991

Após inoculação, devem operar-se os digestores anaeróbios a uma carga orgânica mássica baixa, sendo o valor preconizado por HENZE E HARREMÕES (1983) de 0.1 kgCQO/kgSSV.dia. Segundo estes autores o valor da carga orgânica pode ser elevado à taxa de 50% por semana, após o início da produção de metano.

AUSTERMANN-HAUN *et al.* (1994) operaram 5 digestores de leito fixo de fluxo ascendente em paralelo no sentido de avaliar a importância de vários parâmetros na fase de arranque. Os parâmetros testados foram: superfície do suporte, recirculação, adição de cálcio, adição de coagulantes, estratégia de aumento da carga orgânica e qualidade do inóculo. Concluíram que a recirculação, a estratégia de aumento da carga orgânica a actividade do inóculo e a adição de cálcio eram os parâmetros que mais afectavam o decorrer da fase de arranque.

A utilização de um inóculo adaptado ao tipo de efluente a tratar, parece ser um factor de primordial importância no arranque de qualquer tipo de digestor. Por exemplo ASPÉ *et al.* (1997) referem que a utilização de um inóculo de sedimentos marinhos permite um arranque mais rápido de digestores para tratar efluentes de processamento de peixe .

2.3.4 Modelos de escoamento em filtros anaeróbios

A acumulação de biomassa ao longo do tempo num filtro anaeróbio, reduz o volume disponível para a fase líquida, diminuindo o tempo de retenção hidráulico.

MUELLER E MANCINI (1975), modelizaram um filtro anaeróbio como uma série de três reactores perfeitamente agitados. Estes autores verificaram que, para uma carga orgânica de 10 kg CQO/m³.dia e utilizando um substrato constituído por proteínas e hidratos de carbono, apenas cerca de 40% do volume inicial do sistema estava disponível para o acesso da fase líquida, sendo o restante ocupado pelos sólidos acumulados.

HALL (1982), efectuou experiências usando titrio como traçador, tendo concluído que um filtro anaeróbio em operação, se comportava basicamente como um sistema de mistura perfeita com um curto circuito de 10 a 15% do caudal total.

YOUNG (1983) refere que num filtro anaeróbio, a acumulação dos sólidos biológicos e a produção de biogás induzem o efeito de mistura. No entanto, DAHAB E YOUNG (1982) haviam sugerido que o fluxo em filtros anaeróbios se aproxima do pistão. YOUNG E YOUNG (1988), determinaram o escoamento dum filtro anaeróbio segundo um modelo compartimental composto por zonas de mistura perfeita, de fluxo pistão e zonas mortas, realizando experiências de DTR com Cloro 36 como traçador. Nesse estudo a biomassa foi simulada com agar e o biogás com injeção de ar.

SMITH *et al.* (1996) estudaram a influência da altura do leito, da quantidade de sólidos e da velocidade do líquido e do gás no tipo de escoamento em filtros anaeróbios à escala piloto e laboratorial. Propuseram um modelo com duas zonas de escoamento ideal, uma de fluxo pistão e outra perfeitamente agitada, ambas interligadas a uma zona morta.

2.3.5 Estudos laboratoriais de aplicação de filtros anaeróbios

O filtro anaeróbio tem sido objecto de vários estudos sobre a sua aplicabilidade a diferentes tipos de efluentes industriais (Tabela 2.5). No entanto, contrariando a tendência geral do crescimento das publicações científicas, o número de publicações relativas a estudos com filtros anaeróbios não tem aumentado nos últimos anos, pelo menos nas revistas que integram o *Biotechnology Citation Index* (Figura 1.2., **sub-Capítulo 1.1.2**, pág. 29). Existem contudo na literatura referências a aplicações laboratoriais do filtro anaeróbio a vários tipos de efluentes industriais nomeadamente de indústrias alimentares e laticíneos (RITTMANN *et al.*, 1982, HAWKES *et al.*, 1995), de indústrias farmacêuticas (JENNET E DENNIS, 1975), de matadouros (TRITT, 1992, RUIZ *et al.*, 1997), de fermentação de melaços e produção de cerveja (DAHAB E YOUNG, 1981, RIERA *et al.*, 1982, CARRONDO *et al.*, 1982), de lixiviados de aterros sanitários (DE WALLE E CHIAN, 1977, DONOVAN, 1981), de produção de pasta de papel, (NORRMAN, 1983), e de suiniculturas (REYNOLD, 1986, MARQUES, 1988). Noutros estudos utilizam-se efluentes sintéticos (YOUNG E MCCARTY, 1967, ALVES *et al.*, 1997 b)

2.3.6 Aplicações industriais de filtros anaeróbios

Desde 1972 construíram-se várias unidades à escala industrial, embora poucas dessas unidades estejam documentadas na literatura científica acessível. Há cerca de dez anos, estimava-se que existiam na Europa cerca de cinquenta unidades à escala industrial, das quais dois terços de fluxo ascendente (ROZZI, 1988).

Tabela 2.5 Exemplos de aplicação do filtro anaeróbio de fluxo ascendente à escala laboratorial e piloto

Tipo de substrato	T [°C]	CQO entrada[g/L]	características do leito	Carga orgânica [kgCQO/m ³ d]	TRH	Eficiência (%)	Ref. ^a
proteínas e hidratos de carbono	25	1.5 - 3.0	28.5 L, seixos de quartzite	0.42 - 3.4 (T)	4.5 - 72 h (T)	36.7 - 93.4	YOUNG E MCCARTY, 1967
ácidos voláteis	25	1.5 - 6.0	28.5 L seixos de quartzite	0.42 - 3.4 (T)	4.5 - 72 h (T)	68.4 - 99.4	YOUNG E MCCARTY, 1967
Efluente de indústria farmacêutica	37	1.8-7.0	14.3 L, seixos de quartzite $\epsilon=47\%$	0.221 - 3.52 (Lq)	48-12 h (Lq)	94 - 97 (solúvel)	JENNETT E DENIS, 1975
Lixiviado de aterro	25	32-54	67.8 L meio plástico 206 m ² /m ³ $\epsilon=94\%$	0.43 - 4.3 (T)	74-7.5 dias (T)	94 - 97	DEWALLE E CHIAN, 1976
Efluente lácteo sintético	22.8 ±1.3	3.84±0.47	29.6 L material plástico	1.28±0.20 (T)	3.0±0.3 dias (T)	90	RITTMAN <i>et al</i> , 1982
Efluente lácteo real	23.1 ±0.3	3.94±0.47	29.6 L material plástico	1.20±0.20 (T)	3.2±0.3 dias(T)	89.6	RITTMAN <i>et al</i> , 1982
Efluente de fermentação de melaço	18 - 29	10 - 50	120 L cerâmico 45 m ² /m ³ $\epsilon=76\%$	2 - 12 (Lq)	5-2 dias (Lq)	57 -79	CARRONDO <i>et al</i> , 1982
Efluente suinícola	30	16.4-33.6	21.6L argila 137 m ² /m ³ $\epsilon=72\%$	5.8-17.4 (Lq)	3-1 dias (Lq)	64-78	REYNOLDS, 1986
Soro (efluente sintético)	30	10	17 L 179 m ² /m ³ $\epsilon=94\%$	2.5-20 (Lq)	4-0.5 dias (Lq)	67-94	REYNOLDS E COLLERAN, 1986
Efluente de produção de levedura	35	5.4-30	5 L 230 m ² /m ³ $\epsilon=95\%$	1.8-10 (n.d.)	3 dias (n.d.)	43-74	VAN DER MERVE E BRITZ, 1993
Efluente de produção de gelados	35	4.93±1.16	5 m ³ 160 m ² /m ³ $\epsilon=95\%$	6.38±1.85	0.93 dias	66.9±11.3	HAWKES <i>et al</i> , 1995
Efluente de matadouro	37	5.2-11.4	2 L, anéis de Raschig em PVC	0.88-11.2 (CQO total) (n.d.)	7.1-0.5dias (n.d.)	91.5-69.1	RUIZ <i>et al</i> , 1997
Efluente lácteo sintético	35	3-12	17.7 L, PVC 230 m ² /m ³ , $\epsilon=95\%$	1.4-6.1(Lq)	2.1	97.9-98.8	ALVES <i>et al</i> , 1997 b

(T) valores calculados com base no volume total de reator. (Lq) valores calculados com base no volume de líquido de reator. n.d - não está definido qual o volume utilizado nos cálculos. ϵ - porosidade do leito.

BONASTRE E PARIS (1989) e YOUNG (1991) compilaram dados sobre aplicações industriais do filtro anaeróbio. Na Tabela 2.6 estão registados alguns exemplos.

A maioria das unidades opera de modo ascendente e normalmente são tanques cilíndricos com diâmetros entre 6 e 26 metros e altura entre 3 e 13 metros. A carga orgânica aplicada varia entre 0.2 e 16 kg CQO/m³.dia e o tempo de retenção entre cerca de 12 e 96 horas (YOUNG E YANG, 1989). O tipo de efluente tratado é muito variável, desde o efluente doméstico com uma CQO de 100 a 150 mg/L, a efluentes de destilarias com CQO da ordem de 100000 mg/L. YOUNG E YANG (1989) referem que os parâmetros mais importantes no projecto destes digestores são o tempo de retenção hidráulico, o meio de suporte e a direcção do fluxo.

Tabela 2.6. Exemplos de aplicação do filtro anaeróbio de fluxo ascendente à escala industrial.

Tipo de substrato	T [°C]	características do leito	CQO entrada [g/L]	Carga orgânica [kgCQO/m ³ d]	TRH	Eficiência (%)	Ref. ^a
Efluente de refinaria de açúcar	-	2*2700 m ³	-	15-20 (CBO)	1 dia	70-80	referido em COLLERAN <i>et al.</i> , 1983
Efluente de destilaria de rum	35	13200 m ³ , plástico, fluxo descendente	80-105	8.9	7.8 dias	-	SZENDRY, 1983
Efluentes com produtos químicos	35	2000 m ³ 98m ² /m ³ ε=95%	10-30	4-2	4 - 1.4 dias	80-95	YOUNG E YOUNG, 1991
Efluente de processamento de milho e ervilha	mesó-filo	300 m ³	16.8-25.5	6-6.5	2.7 - 3.1 dias	73	BORTONE E PICCININI, 1988
Efluente doméstico	15-25	56 m ³ anéis de Pall 90 mm	100-150 (CBO)	0.1-1.2	12-18 h	50-71	HARRIS <i>et al.</i> , 1985
Efluente de indústria farmacêutica	35	6400 m ³	12	8-12	24-36 h	75-85	KATZEL, 1981

2.4 Metodologias de estudo e caracterização de digestores anaeróbios

Quando se inicia um trabalho de investigação no domínio da digestão anaeróbia, é importante ter percepção da complexidade do processo. Técnicas que são básicas noutros processos de fermentação, tais como a medição da concentração celular por densidade óptica ou contagem celular directa, têm aplicação limitada ou nula nestes processos, uma vez que a biomassa se encontra normalmente na forma de agregados e é constituída por um consórcio bacteriano complexo. Será seguidamente feita uma síntese, na perspectiva da aplicação a estudos em digestores, de alguns métodos existentes para caracterização essencialmente da fase sólida, referindo-se ainda algumas técnicas inovadoras de monitorização das fases líquida e gasosa.

2.4.1 Caracterização da fase sólida

2.4.1.1 *Actividade do consórcio microbiano*

A quantidade de biomassa activa num digestor anaeróbio é um factor crítico, determinante na obtenção de elevadas eficiências de tratamento.

Durante muito tempo o arranque dos digestores anaeróbios foi feito empiricamente sendo a carga orgânica de projecto baseada no volume do reactor, sem referência à quantidade e qualidade do inóculo nem à biomassa presente no reactor durante a operação (REYNOLDS, 1986). A quantificação da biomassa, quando existente, era predominantemente medida em termos de sólidos voláteis (VSS), que apesar de ser uma medida simples e que dá uma ideia da quantidade global de biomassa presente, não distingue entre biomassa e outra matéria orgânica particulada, nem fornece informação sobre a actividade metanogénica potencial. Ao contrário dos processos aeróbios em que um único parâmetro global (consumo de oxigénio) pode ser usado como indicador da actividade dos microorganismos, em anaerobiose, embora o metano constitua um dos principais produtos finais, a actividade dos diferentes grupos tróficos deve ser caracterizada (IZA *et al.*, 1991). Os métodos presentemente disponíveis para caracterizar a biomassa podem ser classificados do seguinte modo:

Análise directa da população microbiana e medida de componentes intracelulares

As técnicas microbiológicas convencionais possuem muitas limitações quando aplicadas à caracterização de consórcios microbianos complexos como é o caso da biomassa presente em digestores anaeróbios. A contagem microscópica directa não distingue entre biomassa viável e não viável e é particularmente problemática quando aplicada à caracterização de biomassa anaeróbia. As diluições podem ser complicadas pela existência de agregados. As técnicas de contagem indirecta por vezes fornecem resultados subestimados devido à destruição das relações de sintrofia do consórcio, além de serem estimativas estatísticas dos valores reais. MORGAN *et al.* (1991) referem que com a técnica *número mais provável* (NMP) se obtém um número entre 10 e 1000 vezes inferior ao obtido com a contagem directa. Estes autores referem uma “relativa inconsistência” dos dados obtidos com a técnica NMP aplicada à caracterização da biomassa em diferentes tipos de digestores, concluindo, contudo, que este método permitiu obter uma informação geral sobre as alterações verificadas nos consórcios analisados. Do ponto de vista prático, o lento crescimento das bactérias anaeróbias implica que, para as maiores diluições, se tenha de esperar longos períodos de tempo até observar crescimento (DOLFING E BLOEMEN, 1985). Estes autores referem ainda a obtenção de resultados erráticos com esta metodologia, apontando-lhe também algumas das limitações já referidas, nomeadamente a destruição das relações sintróficas.

As técnicas usando sondas imunológicas, aplicadas à identificação de bactérias metanogénicas por MACÁRIO E MACÁRIO (1985) e por PRENSIER *et al.* (1987), parecem fornecer um elevado poder de resolução na identificação de várias espécies de bactérias metanogénicas que normalmente não se consegue com as técnicas habituais de microscopia. Por exemplo KOBAYASHI *et al.* (1988) complementaram com a análise imunológica as observações microscópicas da flora microbiana complexa que se desenvolveu em dois digestores anaeróbios. Concluíram que, além de *Methanosarcina* e *Methanothrix*, presentes em ambos os digestores e facilmente identificáveis no microscópio, existiam espécies de *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter* e *Methanogenium* e que, dependendo do grau de

turbulência de cada digestor se desenvolviam diferentes espécies de bactérias metanogénicas.

A utilidade da microscopia óptica de fluorescência baseia-se na existência de uma substância de nome trivial factor F_{420} , isolada pela primeira vez em *Methanobacterium* M.o.H, (CHEESEMAN *et al*, 1972) que absorve fortemente a 420 nm na forma oxidada, emitindo uma fluorescência de cor azul esverdeada após excitação a esse comprimento de onda. Esta característica não é absolutamente exclusiva das bactérias metanogénicas pois aparece também em algumas espécies de *Streptomyces* analisadas, sabendo-se que está envolvido como aceitador de electrões na síntese de alguns antibióticos. No entanto os níveis de F_{420} em *Streptomyces* são cerca de 10 a 100 vezes inferiores aos encontrados nas bactérias metanogénicas (DANIELS, 1991) e, em termos práticos, considera-se que permite diferenciá-las das não metanogénicas (VOGELS *et al.*, 1988). A identificação de diferentes espécies com base nos teores de F_{420} não é evidente (MINK E DUGAN, 1977, DODDEMA E VOGELS, 1978). A quantificação do F_{420} intracelular foi sugerida por DELAFONTAINE *et al.* (1989), como medida da actividade metanogénica global parecendo ser um método potencialmente atractivo. No entanto, tem a desvantagem de apresentar teores muito variáveis de espécie para espécie (Tabela 2.7). Além disso, os teores de F_{420} numa dada espécie variam com as condições ambientais, o que obviamente complica a interpretação dos dados obtidos (COLLERAN *et al.*, 1992). Por exemplo, um dos géneros normalmente dominante nos digestores anaeróbios, *Methanosaeta* (ex *Methanothrix*), apresenta um valor de F_{420} relativamente baixo apresentando-se um exemplo na Tabela 2.7 para a então designada *Methanothrix soehngenii*. Outra desvantagem é que, do ponto de vista prático, as técnicas de análise são complexas para análises de rotina e além disso a molécula F_{420} não existe disponível no mercado sendo a sua produção em laboratório fastidiosa por requerer o crescimento das bactérias, extracção das coenzimas e posterior purificação (DANIELS, 1991).

Tabela 2.7 Teores de F_{420} em diversas espécies de bactérias metanogénicas (REYNOLDS, 1986, DOLFING E MULDER, 1985).

	Espécie	F_{420} (nmol/gVSS)
Hidrogenotróficas	<i>Methanobacterium formicicum</i>	1200
	<i>Methanobacterium bryantii</i>	1400
	<i>Methanobrevibacter ruminantium</i>	40
	<i>Methanobacterium arboriphilus</i>	1800
	<i>Methanogenium marisnigri</i>	700
	<i>methanospirillum hungatii</i>	1900
Acetoclásticas	<i>Methanosarcina acetivorans</i>	27
	<i>Methanotherix soehngenii</i>	330

A medida de ATP pode ser um indicador da actividade global e alguns trabalhos referem a sua aplicação como medida da actividade global em processos anaeróbios (HANAKI *et al.*, 1981, CHUNG E NEETHLING, 1988). No entanto, dado que a biomassa anaeróbia se apresenta predominantemente na forma de agregados mais ou menos compactos sendo além disso uma cultura altamente heterogénea, a fase de ruptura celular será um passo crítico a otimizar e além disso os problemas colocados a nível da interpretação dos resultados serão provavelmente semelhantes aos já referidos para o F_{420} . A comparação de valores dos parâmetros atrás citados com dados da literatura torna-se difícil, dado que em muitos casos são utilizados métodos analíticos diversos, os valores são expressos em unidades também diversas sendo, por vezes, ambígua a sua inter-conversão (REYNOLDS, 1986).

Estimativa de variáveis de estado

O desenvolvimento de sensores por programação (“*Software sensors*”) para estimativa de variáveis de estado e de parâmetros em processos biotecnológicos, constitui uma alternativa à falta de meios técnicos de análise (FERREIRA, 1995). A aplicação destas metodologias à digestão anaeróbia tem sido abordada por diversas equipas, salientando-se os trabalhos desenvolvidos na Universidade Católica de Louvaina. Destes trabalhos foram obtidos alguns resultados práticos na perspectiva do controlo de determinados parâmetros para aplicação em digestores anaeróbios perfeitamente agitados (RENARD *et al.*, 1991, BELLOUTI, 1994). Com estes métodos é possível, estimar em linha, a quantidade de biomassa presente num digestor anaeróbio, recorrendo a modelos matemáticos do processo e à medição de algumas variáveis. Contudo, a aplicação destas metodologias a sistemas com retenção de

biomassa tem sido limitada, devido à complexidade acrescida destes sistemas face aos de mistura completa.

Testes de actividade em reactor fechado.

Os métodos mais largamente utilizados na caracterização da biomassa em digestores anaeróbios são normalmente referidos como “testes de actividade metanogénica específica”. Realizam-se em reactor fechado, e monitoriza-se ao longo do tempo uma variável indicadora da actividade. Na maior parte dos métodos o indicador de actividade é a produção de metano e não o consumo de substrato, variando fundamentalmente de uns métodos para os outros a técnica utilizada para medição do metano produzido. Nos primeiros métodos desenvolvidos, o metano era medido por deslocamento de líquido (VALCKE E VERSTRAETE, 1983). Este método continua a ser utilizado (SOTO *et al.*, 1993). Surgem também referências à utilização do deslocamento de êmbolos de seringas de vidro cujas agulhas eram directamente colocadas no frasco através da rolha de borracha (OWEN *et al.*, 1979) e o respirómetro de *Warburg* também é utilizado para medição de metano (JAMES *et al.*, 1990).

DOLFING E BLOEMEN (1985) desenvolveram um método em que a produção de metano é seguida por análise cromatográfica do gás produzido em frascos selados. Para tal, o gás deve ser amostrado por seringas que possibilitem a amostragem, independentemente da pressão existente no frasco. Estes autores aplicaram o método para obter informação sobre os diferentes grupos tróficos, usando substratos específicos, nomeadamente H_2/CO_2 para avaliar actividade das bactérias hidrogenotróficas. Verificaram que as limitações do transporte do H_2 da fase gasosa para a fase líquida podiam ser resolvidos por agitação mecânica. Alternativamente, sugerem a utilização do formato como substrato substituto do H_2/CO_2 , para avaliar a actividade metanogénica hidrogenotrófica, embora refiram, citando BALCH *et al.* (1979) que, cerca de 50% das metanogénicas hidrogenotróficas não consomem formato. Referem ainda que é possível estimar a proporção de cada grupo trófico presente numa determinada amostra de biomassa, por comparação entre a produção de metano da amostra devida a um substrato específico e a produção de metano de culturas puras que convertem o mesmo substrato. Estes autores compilaram dados de actividades

metanogénicas específicas de diferentes grupos tróficos de bactérias metanogénicas em cultura pura (Tabela 2.8).

O método de DOLFING E BLOEMEN, (1985) não é muito atractivo do ponto de vista prático, por envolver inúmeras análises cromatográficas. Além disso, as velocidades iniciais (quando a %CH₄ é baixa) são afectadas de um erro considerável (COLLERAN *et al.*, 1992). Contudo a utilização de substratos específicos é considerada atractiva para investigar a composição de consórcios. SORENSEN E AHRING (1993) também referiram a importância de medir a actividade metanogénica potencial de diferentes grupos fisiológicos envolvidos no processo de degradação anaeróbia e desenvolveram um método que se baseia no de DOLFING E BLOEMEN (1985).

Tabela 2.8 Actividades metanogénicas específicas de alguns grupos metabólicos de bactérias envolvidas em ecossistemas metanogénicos (adaptado de DOLFING E BLOEMEN, 1985).

	Espécie	Substrato	actividade methanogénica (ml CH ₄ @ PTN/g células.min)
Hidrogenotróficas	<i>Methanobacterium formicicum</i>	H ₂	7.84-12.3
	<i>Methanobacterium bryantii</i>	H ₂	6.72
	<i>Methanobrevibacter arboriphilus</i>	H ₂	13.44
	<i>Methanospirillum hungatei</i>	H ₂	5.82
Acetoclásticas	<i>Methanothrix soehngenii</i>	acetato	0.54
Metanogénicas metabolicamente versáteis	<i>Methanosarcina barkeri</i> (Fusaro)	H ₂	4.48
	<i>Methanosarcina barkeri</i> (DM)	H ₂	2.13
	<i>Methanosarcina barkeri</i> (Fusaro)	acetato	0.67
	<i>Methanosarcina barkeri</i> (MS)	acetato	1.34
	<i>Methanosarcina barkeri</i> 227	acetato	3.81

SHELTON E TIEDJE (1984) usaram pela primeira vez transdutores de pressão aplicados a ensaios de biodegradabilidade. Este método foi adaptado por REYNOLDS (1986) e CONCANNON *et al.* (1988) da Universidade de Galway na Irlanda para aplicação a testes de actividade metanogénica usando substratos não gasosos (acetato, butirato, propionato, etanol, metanol, formato). Os transdutores usados para medir electronicamente a pressão foram especialmente desenhados de acordo com as condições operatórias dos testes (volume, concentração de biomassa e substrato), de modo a garantirem o máximo rigor nas leituras

de pressão. CONCANNON *et al.* (1988) desenvolveram também um sistema computadorizado permitindo a medição simultânea em vários frascos. A medição do conteúdo em metano no final do ensaio permite a correlação da pressão desenvolvida com o metano produzido. Posteriormente, o método foi estendido à medição da actividade metanogénica usando substratos gasosos, permitindo avaliar a actividade das bactérias hidrogenotróficas. Para uma elevada actividade hidrogenotrófica, verificou-se que a transferência de H₂ para a fase líquida era o passo limitante, tendo sido desenvolvido um rigoroso protocolo definindo as condições de mistura, pressão inicial e fracção de volume de gás *versus* líquido. A área de transferência gás-líquido foi maximizada aumentando o volume dos frascos e mantendo-os em agitação na posição horizontal durante o teste. (COATES *et al.*, 1996).

Entre os vários métodos existentes actualmente, este método, desenvolvido na equipa de EMER COLLERAN da Universidade de Galway é interessante porque permite obter resultados muito reprodutíveis da actividade metanogénica de diferentes grupos tróficos do consórcio e permite avaliar a toxicidade de compostos sobre grupos tróficos individualizados (COLLERAN *et al.*, 1992). Além disso é viável para caracterizar biomassa de digestores laboratoriais, pois requer pequenas quantidades de biomassa (cerca de 2 g de sólidos voláteis são suficientes para realizar testes em triplicado com 5 substratos diferentes e incluindo os ensaios de controlo (REYNOLDS, 1986)) e, do ponto de vista prático é expedito. Este método é usado nos **Capítulos 3, 4 e 5** desta dissertação, para medir actividade, toxicidade e biodegradabilidade metanogénicas.

2.4.1.2 Caracterização física de agregados microbianos

O desenvolvimento do digestor UASB (LETTINGA *et al.*, 1980) conduziu a numerosos trabalhos de investigação no estudo dos agregados microbianos presentes em sistemas de tratamento anaeróbio de efluentes (HULSHOFF POL *et al.*, 1986, SCHMIDT E AHRING, 1996, FANG, 1997). O conceito UASB, baseado na estrutura granular da biomassa e na retenção da mesma sem auxílio de material de suporte, é particularmente atractivo. No entanto, existem na literatura descrições de desintegração granular conduzindo à flutuação e perda da biomassa, afectando o funcionamento do sistema de uma forma rápida e irreversível (HAWKES *et al.*, 1995, RINZEMA, 1988). A perda das características granulares está muitas vezes

associada com a acumulação de gás em cavidades formadas no interior dos grânulos (YODA E NISHIMURA, 1997). As características de sedimentação são alteradas e a biomassa é arrastada com a corrente de saída do digestor. Este fenómeno é referido como sendo a principal desvantagem deste sistema de tratamento (WEILAND E ROZZI, 1991, HAWKES, *et al.*, 1995). Não é portanto de estranhar que, mesmo usando biomassa granular, se utilize às vezes, e por precaução, um suporte sólido para retenção da mesma. Este suporte pode ser colocado apenas na zona superior do digestor (no caso dos reactores híbridos) ou em todo o seu volume, como acontece por exemplo, numa unidade à escala industrial instalada numa fábrica de produção de ácido cítrico, na Irlanda, passando a tratar-se dum processo de leito fixo (FINNEGAN, 1994).

Alguns tipos de efluentes são praticamente incompatíveis com a existência de biomassa granular. Efluentes ricos em lípidos, por exemplo, provocam a flutuação da biomassa mesmo para concentrações inferiores aos índices de toxicidade dos ácidos gordos de cadeia longa, produtos da sua hidrólise e altamente inibidores do processo de degradação anaeróbia (HWU, 1997, ALVES *et al.*, 1997 a).

A distinção entre biomassa granular (entendida como a que permite o bom desempenho dos reactores UASB) e não granular (que não permite o funcionamento dos digestores UASB) é uma aspecto de particular relevância no estado actual de conhecimentos em digestão anaeróbia.

DOLFING (1987) distinguiu três tipos básicos de agregados que podem surgir em digestores anaeróbios de alta carga: (a) flocos que são agregados sem uma estrutura definida e que após sedimentação não podem ser individualizados; (b) flocos mais densos a que chamou "*pellets*" que têm uma estrutura mais compacta do que os flocos e que após sedimentação se mantêm como entidades individualizadas e (c) grânulos que são estruturas muito densas, são firmes, suportam um certo grau de compressão, têm uma forma regular e uma superfície bem definida (ALPHENAAR, 1994). Parâmetros como a densidade, o tamanho a sedimentabilidade e a resistência mecânica, definem quantitativamente as características físicas da biomassa granular (HULSHOFF POL, 1989). Este autor refere valores de densidade entre 1030 e 1080 kg/m³ e de velocidade de sedimentação da ordem dos 90 m/h para a biomassa granular. A biomassa floculenta, no entanto, devido à sua natureza deformável e consequente

dificuldade de manuseamento é normalmente caracterizada por descrições qualitativas baseadas na observação directa.

São referidas na literatura relações entre a cor, a actividade metanogénica e a rugosidade da superfície dos grânulos (KOSARIC E BLASZCZYK, 1990). De acordo com estes autores, grânulos negros são normalmente mais activos e esféricos do que os que apresentam uma cor cinzenta ou branca. Este facto sugere que a quantificação da morfologia da superfície pode ser útil na caracterização e diferenciação de agregados microbianos. Além disso, a rugosidade da superfície é um parâmetro importante a considerar no estudo de agregados microbianos e biofilmes, dado que afecta o ambiente hidrodinâmico da interface fluido-partícula e a área disponível para os processos de transporte, adsorção ou permuta (ZAHID E GANCZARCKZYK, 1994).

A quantificação da rugosidade da superfície pela medida da dimensão fractal foi proposta como mais um parâmetro para diferenciar biomassa granular e floculenta (BELLOUTI *et al.*, 1997). A dimensão fractal é um parâmetro numérico emergente da teoria fractal desenvolvida por MANDELBROT (1982), que permite descrever sistemas ou objectos com formas irregulares ou indefinidas. Basicamente, enquanto as dimensões no espaço euclideano são números inteiros 0, 1, 2 ou 3 para pontos, linhas, superfícies ou volumes respectivamente, a teoria fractal assume que as dimensões, podendo ser fraccionárias, descrevem melhor as formas dos sistemas, objectos e Universo em geral. Os campos de aplicação da teoria fractal são inúmeros, incluindo agregados microbianos presentes em sistemas de tratamento de efluentes (LI E GANCZARCZYK, 1989) e biofilmes (ZAHID E GANCZARCZYK, 1994, HERMANOWICZ *et al.*, 1996).

2.4.2 Caracterização das fases líquida e gasosa

2.4.2.1 Técnicas tradicionais de monitorização

As técnicas tradicionais de monitorização da fase líquida e gasosa em digestores anaeróbios, nomeadamente a análise da carência química de oxigénio, pH, ácidos voláteis, alcalinidade, metano etc, são conhecidas, não sendo objectivo do presente trabalho fazer

uma revisão dos métodos disponíveis para as efectuar. Usualmente utilizam-se os métodos referidos no “*STANDARD METHODS*”.

Relativamente aos ácidos voláteis, contudo, convém referir que a utilização de HPLC na substituição da tradicional análise por cromatografia gasosa permite a análise do formato, um intermediário importante em condições de alta carga (GROBICKI E STUCKEY, 1991). A análise por GC não permite a análise do formato, uma vez que este é utilizado para saturar o gás de arraste ou é misturado com as amostras antes da injeção (ZÁBRANSKÁ E DOHÁNYOS, 1987).

O hidrogénio dissolvido na fase líquida é um importante intermediário no processo, normalmente difícil de quantificar. O facto da sua concentração na fase gasosa ser geralmente muito baixa (10-500 ppm) acrescido da sua baixa solubilidade na água (75 nmol/L para uma concentração no gás de 100 ppm a 35°C), justificam essa dificuldade. No entanto alguns trabalhos referem a utilização de sensores para medição de hidrogénio na fase líquida. PAUSS *et al.* (1988) aplicaram um sensor de hidrogénio usualmente utilizado na indústria química e em reactores nucleares e referem que responde rápida e eficientemente a variações na concentração de hidrogénio dissolvido e que não sofre interferência de outros metabolitos excepto do H₂S que tem tendência a envenenar progressivamente o sensor.

HICKEY E SWITZENBAUM, (1988) referem também a importância da medição de produtos gasosos intermediários, nomeadamente monóxido de carbono (um intermediário na formação de metano a partir do acetato) e hidrogénio, como indicadores do estado metabólico da população microbiana presente. Estes autores referem que a medida em linha destes componentes no gás permite avaliar rapidamente o estado do digestor, permitindo a actuação rápida em caso de sobrecargas orgânicas ou hidráulicas. A detecção destes compostos neste caso foi feita por infravermelhos (CH₄ e CO₂) e por cromatografia gasosa (H₂ e CO). Contudo, KIDBY E NEDWELL (1991) investigaram o efeito de sobrecargas hidráulicas nos níveis de hidrogénio no biogás, para avaliar a utilidade deste parâmetro como alarme indicador de instabilidade. Concluíram que os níveis de hidrogénio só aumentam após a falha irreversível do sistema, limitando a sua utilidade como detector de problemas operacionais.

2.4.2.2 Potencialidades da utilização da espectrometria de massa

Apesar da espectrometria de massa ser uma das mais antigas técnicas instrumentais de análise, apenas recentemente se tem avaliado as suas elevadas potencialidades em aplicações biológicas e biotecnológicas (HEINZLE, 1992).

A aplicação da espectrometria de massa em bioprocessos é actualmente praticamente restrita à medição da fase gasosa e as aplicações desta técnica na digestão anaeróbia são escassas. SCOTT *et al.* (1983), referem a utilização da medição em linha de compostos voláteis presentes na fase líquida (CH_4 , H_2 , CO_2 e O_2) por espectrometria de massa usando membranas e DORNSEIFFER *et al.* (1995) estudaram a cinética de degradação de formato a metano usando a mesma metodologia. A aplicação da espectrometria de massa para análise em linha de voláteis presentes nas fases líquida e gasosa parece apresentar grandes potencialidades. No entanto, esta técnica é dispendiosa e os espectrómetros de massa actualmente existentes no mercado são mais apropriados para medição de gases e líquidos em fermentadores aeróbios de mistura completa, pois os aparelhos funcionam com aspiração de um certo caudal de gás que é, em geral, muito elevado. No caso dos digestores anaeróbios, os caudais de gás dependem das condições operatórias e do volume do reator e em muitos casos o gás produzido não é suficiente para a análise. De um modo geral considera-se a espectrometria de massa uma técnica potencialmente atractiva para estudos laboratoriais, após a resolução de alguns problemas práticos. No **Apêndice B** desta dissertação está descrita a tentativa de medição da composição do biogás produzido no filtro anaeróbio segmentado por espectrometria de massa.

2.4.2.3 Determinação das características hidrodinâmicas

Fundamentos teóricos

O desempenho de qualquer sistema de tratamento biológico de efluentes é determinado pelo tempo que o substrato reside no reator e pelo grau de contacto entre o substrato e a população microbiana activa, determinado pelo regime hidráulico do sistema (YOUNG, 1991, CHIANG *et al.*, 1992). A importância de um certo grau de mistura na eficiência dos processos de tratamento anaeróbio de efluentes foi referida por MONTEITH E STEPHENSON (1981), embora

a definição do óptimo regime hidráulico seja controversa. Em condições de fluxo pistão os elementos de fluido permanecem no sistema um tempo de retenção, proporcionando ao substrato o máximo tempo para ser convertido. Não há mistura entre os elementos de fluido de diferentes pontos do reactor e as propriedades apresentam uma variação espacial determinada pela cinética do processo (Figura 1.4 (b)). Contudo, podem ocorrer zonas artificialmente sobrecarregadas por acumulação de altas concentrações locais de substrato ou produtos da sua degradação, tais como ácidos voláteis, intermediários associados com a instabilidade do processo de degradação anaeróbia (DALLA TORRE E STEPHANOPOULOS, 1986). Por outro lado, em situações de elevada dispersão (Figura 1.4 (a)) pode haver curto-circuito do substrato apenas parcialmente degradado.

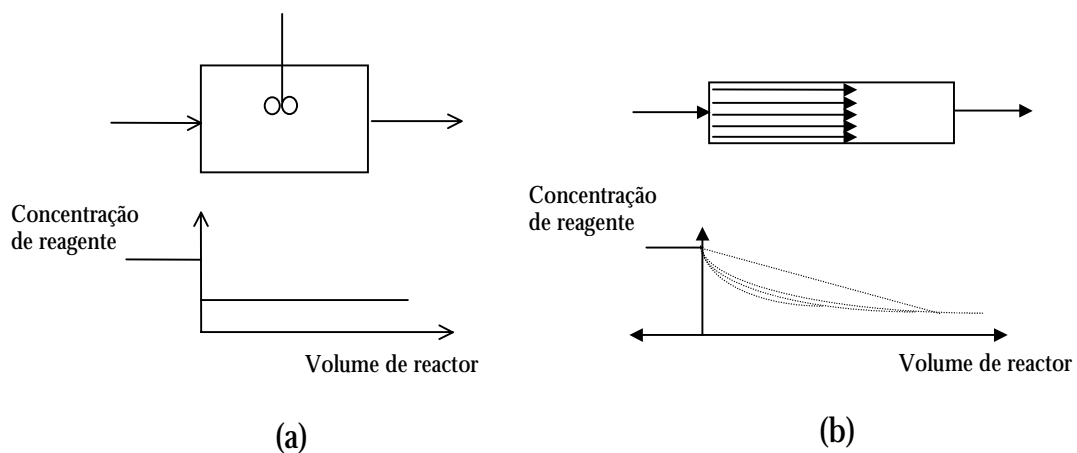


Figura 2.4. Representação esquemática de duas unidades de fluxo ideal. mistura completa (a) e escoamento pistão (b).

SMITH *et al.*, (1996) sugerem que um grau intermediário de mistura é óptimo para a conversão do substrato em filtros anaeróbios. Na verdade, o padrão de escoamento de qualquer reator real situa-se entre os dois limites de idealidade representados na Figura 1.4, podendo aproximar-se mais do carácter de mistura completa ou mais do carácter pistão. O grau de mistura em filtros anaeróbios depende da geometria do digestor, da estrutura do suporte, da entrada e saída de líquido, da quantidade de biogás produzido, do crescimento da biomassa e da existência ou não de recirculação do efluente ou de biogás.

Após os trabalhos de DANCKWERTS (1953), a utilização da Distribuição de Tempos de Residência (DTR) na análise de reactores reais passou a ser um conceito amplamente usado. A distribuição de tempos de residência é determinada experimentalmente pela técnica estímulo-resposta (LEVENSPIEL, 1972). Esta técnica baseia-se na injeção, segundo uma forma definida (normalmente em degrau positivo, negativo ou em impulso de *Dirac*) na entrada do reactor no instante $t=0$ de uma substância inerte (traçador) e na medição da concentração de traçador na corrente de saída a partir do tempo $t=0$. O traçador deve ser não reactivo, não adsorvido pelo conteúdo do reactor, deve ser facilmente detectável e deve ter propriedades físicas semelhantes às da mistura reagente. Pela curva “concentração, $C(t)$ *versus* tempo, t ”, calcula-se a função Distribuição de Tempos de Residência, $E(t)$ segundo:

$$E(t) = \frac{C(t)}{\int_0^{\infty} C(t)dt} \quad (2.20)$$

O tempo de residência médio (TRM) é calculado pela média da curva $E(t)$:

$$TRM = \int_0^{\infty} t \times E(t)dt \quad (2.21)$$

O tempo de residência médio assim calculado representa a razão entre o volume efectivo do digestor e o caudal aplicado. Com este valor é possível estimar a fracção de volume morto dentro do sistema, de acordo com a seguinte equação 2.22:

$$FVM(\%) = \left(1 - \frac{TRM}{t}\right) \times 100 \quad (2.22)$$

Com o objectivo de tornar a função $E(t)$ independente do volume de reactor, utiliza-se frequentemente a sua forma normalizada $E(\theta)$, em que θ é o tempo real, t dividido pelo tempo de residência τ ($\theta=t/\tau$). A relação entre as duas funções é: $E(\theta)=\tau \cdot E(t)$. A análise da função $E(\theta)$ permite caracterizar o padrão de escoamento de reactores reais e averiguar a existência de zonas estagnadas ou de mistura ineficiente, de canais preferenciais e de curto-

circuitos, factores que afectam negativamente o funcionamento de qualquer sistema de fluxo.

Modelos de escoamento com um só parâmetro

(i) Modelo de Dispersão

LEVENSPIEL E SMITH (1957) desenvolveram um modelo de dispersão que é válido em situações de fluxo pistão com diferentes graus de dispersão axial. Como se trata de um modelo simples com apenas um parâmetro (*número de Peclet*, $Pe = \text{fluxo convectivo}/\text{fluxo dispersivo}$), permite facilmente a avaliação e comparação da dispersão em situações reais.

A equação do modelo para um baixo nível de dispersão é:

$$E(\theta) = \frac{1}{2} \sqrt{\frac{Pe}{\pi \theta^3}} \times \exp \left[-\frac{(1-\theta)^2 Pe}{4\theta} \right] \quad (2.23)$$

em que:

$Pe = uL/D$ é o número de Peclet

u é a velocidade superficial do fluido [Lt^{-1}]

L é a distância linear desde a entrada no reactor [L]

D é a dispersão axial [L^2t^{-1}]

LEVENSPIEL (1972) classificou o tipo de escoamento de acordo com os valores do chamado número de dispersão, $D/uL = 1/Pe$ (Tabela 2.9).

Tabela 2.9 Classificação do tipo de escoamento de acordo com o número de dispersão (LEVENSPIEL, 1972).

tipo de escoamento	número de dispersão ($D/u \cdot L$)
fluxo pistão ideal	0
grau de dispersão pequeno	<0.02
grau de dispersão intermédio	≥ 0.02 e <0.2
grau de dispersão elevado	≥ 0.2
mistura completa	∞

Segundo LEVENSPIEL (1972), a utilização deste modelo para um elevado grau de dispersão pode ser problemática, particularmente para graus de dispersão superiores a 1. O tipo de fronteira que delimita o volume do sistema exerce, nesse caso, uma influência significativa na curva experimental obtida (LEVENSPIEL E TURNER, 1970). Assim, se a medida da concentração à saída do reactor for realizada num tubo estreito onde o fluxo é do tipo pistão, diz-se que as condições fronteira são fechadas. Se a medida da concentração de saída for realizada directamente na secção do reactor, sem perturbação do tipo de fluxo, diz-se que as condições fronteira são abertas.

(ii) Modelo dos tanques agitados em série

A par do modelo de dispersão, o modelo dos tanques em série é um dos mais utilizados na caracterização do escoamento em reactores reais. Este modelo prevê que o reactor real se comporta como uma série de unidades ideais de mistura completa e de volume idêntico. O único parâmetro do modelo, J , é o número de tanques, e a equação do modelo é (FOGLER, 1986):

$$E(\theta) = \frac{J^J \theta^{J-1}}{(J-1)!} \times \exp(-J\theta) \quad (2.24)$$

Quando J é elevado, o escoamento aproxima-se do pistão e quando $J=1$, a mistura é completa. Para um fluxo próximo do pistão os dois modelos referidos dão resultados idênticos.

Modelos compartimentais de vários parâmetros

Os modelos de um só parâmetro referidos são normalmente adequados para descrever o escoamento de uma coluna de enchimento. No entanto, em alguns casos, nenhum desses modelos se adequa à descrição do padrão de escoamento de filtros anaeróbios em operação. Nesses casos, devem utilizar-se modelos compartimentais, que pressupõem que o reactor real é constituído por um conjunto de sub-unidades definidas (unidades ideais de fluxo pistão e mistura completa, zonas mortas, zonas estagnadas), ligadas em série e/ou paralelo, directamente, com curto circuitos ou recirculação. O número de combinações possíveis de

compartimentos é muito elevado, mas deve ter-se em consideração a utilização de um modelo com o menor número de parâmetros possível e com significado físico.

Tipos de traçadores

A técnica de DTR é útil na determinação das características de escoamento em filtros anaeróbios, mas a sua aplicabilidade está fortemente dependente de se encontrarem traçadores que cumpram os requisitos necessários. Alguns autores referem dificuldades na realização de experiências com traçadores usando a técnica estímulo/resposta. MUELLER E MANCINI (1975), atribuíram o fracasso das suas experiências à existência de fenómenos de adsorção e difusão no biofilme para os dois traçadores testados (cloreto de lítio e um corante não especificado). Na Tabela 2.10 estão enumerados diversos traçadores utilizados na caracterização do escoamento em digestores anaeróbios.

Tabela 2.10 Exemplo de alguns traçadores utilizados em digestores anaeróbios

Tipo de reator	Traçador	Referência
Filtro Anaeróbio ascendente	Cloreto de Lítio e Corante	MUELLER E MANCINI, 1975
UASB (V=30 m ³)	Cloreto de Lítio	HEERTJES E VAN DER MEER, 1978
UASB (V=200 m ³)	Cloreto de Lítio	HEERTJES E KUIJVENHOVEN, 1982
Filtro Anaeróbio ascendente	Títio	HALL, 1982
Filtro Anaeróbio descendente	Títio	SAMSON <i>et al.</i> , 1985 a
UASB	Cloreto de Lítio	BOLLE <i>et al.</i> , 1986
Reactor Híbrido	Azul de metileno rodamina B	OLESZKIEWICZ E THANDANI, 1988
Filtro Anaeróbio ascendente	Cloro 36	YOUNG E YOUNG, 1988
Digestor de mistura completa	Cloreto de Lítio	THEOLEYRE E MLAOUHI, 1988
Filtro Anaeróbio descendente	Cloreto de Lítio	PAN VEIRA, 1991
Filtro anaeróbio (5980 L e 68 l)	Cloreto de Lítio	SMITH <i>et al.</i> , 1996

O Cloreto de Lítio é um dos traçadores mais usados porque é estável, todos os seus sais são solúveis e não interfere com a biomassa, pelos menos para baixas concentrações.

No entanto, verificou-se que, para concentrações superiores a 2 g Li⁺/L, mesmo com exposições temporárias a esta substância, era inibidor da actividade metanogénica (ANDERSON *et al.*, 1991). As experiências de determinação de DTR com injeccção de traçador sob a forma de impulso, pressupõem a injeccção rápida de um pequeno volume com elevada concentração (para ser detectável após diluição por todo o volume do sistema), da substância escolhida como traçador. No caso dum filtro anaeróbio, a maior parte da biomassa activa encontra-se na zona inferior do reactor e, se se usar cloreto de lítio com uma injeccção em impulso, poderá haver inibição da actividade metanogénica devido à elevada concentração de traçador nessa região, aquando da injeccção. Nesse caso, será mais aconselhável utilizar um sinal em degrau, mantendo uma concentração mais baixa de traçador em todo o volume do sistema.

3. Comparação de um filtro anaeróbio segmentado com uma configuração tradicional

Sumário

São comparadas duas configurações de filtros anaeróbios de fluxo ascendente. Uma configuração é segmentada em 3 andares com remoção de biogás em cada andar e a outra é uma configuração tradicional. Neste estudo utilizou-se um efluente lácteo sintético, inicialmente sem adição de outros nutrientes. Os digestores operaram de modo instável e com baixas eficiências, mesmo para cargas orgânicas aplicadas inferiores a 1.5 kg CQO/m³.dia. Após a adição de macro e micronutrientes e num primeiro período operatório, avaliou-se o efeito de aumentar a concentração de substrato entre 3 e 12 g CQO/L no desempenho, nos perfis de degradação de substrato, nas características físicas e biológicas da biomassa desenvolvida e nas características hidrodinâmicas das duas configurações. O tempo de retenção hidráulico foi mantido em 2 dias. Em termos de desempenho não houve diferenças significativas. A remoção de CQO foi superior a 97% em ambas as configurações. Os perfis de degradação de substrato indicaram que a maior parte da remoção ocorria na base dos digestores o que foi em parte devido à maior acumulação de biomassa e portanto de actividade nessas secções. No entanto, os efeitos de mistura, induzidos pela produção de biogás também justificaram a forma dos perfis obtidos. O modelo de escoamento que melhor descreveu os digestores era constituído basicamente por uma secção de fluxo pistão à entrada e por uma zona de mistura perfeita que variava entre 65 e 80% dependendo da configuração ser ou não segmentada. As diferenças de escoamento entre as duas configurações foram mais acentuadas para baixas concentrações de substrato. Com o aumento da concentração de substrato a actividade metanogénica acetoclástica e hidrogenofílica passou a ser máxima no topo dos digestores, a actividade acidogénica em lactose foi máxima na base e a actividade em propionato foi máxima na secção central de ambas as configurações. No entanto, todas estas actividades foram detectadas em todas as secções dos digestores. Verificou-se, em geral, uma maior estratificação no digestor segmentado do que no não segmentado. Os agregados não apresentavam características muito diferenciadas nas várias secções dos digestores, embora o seu tamanho e a sua velocidade de sedimentação tenham aumentado com o aumento da concentração de substrato. A introdução de alimentações laterais em FAII, diminuindo o tempo de retenção entre 2 dias e 10 horas, não provou melhorar o funcionamento desta configuração relativamente ao digestor convencional. A actividade acidogénica máxima passou a estar localizada na secção do meio do digestor segmentado, que era o andar que recebia a maior parte da carga orgânica que foi aplicada ao sistema. O volume “morto” dos digestores aumentou para 60%. Os agregados acumulados no topo dos digestores variaram acentuadamente as suas propriedades biológicas e físicas ao longo da operação, tendo passado por máximos acentuados de actividade acetoclástica, tamanho, velocidade de sedimentação e dimensão fractal.

Índice

3.1	INTRODUÇÃO	101
3.2	OBJECTIVOS	106
3.3	MATERIAIS E MÉTODOS	107
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	124
3.5	CONCLUSÕES	228

3.1 Introdução

A operação de digestores segmentados está referida na literatura segundo diferentes pontos de vista (EL-SHAFIE E BLOODGOOD, 1973, HARPER E POHLAND, 1987, GROBICKI E STUCKEY, 1991, VAN LIER *et al.*, 1994, GUIOT *et al.*, 1995). Num sistema de um só andar a operar de modo ascendente, o biogás formado nos estágios iniciais da degradação migra através do digestor, tendo oportunidade de afectar as reacções de degradação que se processam a jusante. Por oposição, num sistema de fluxo descendente, o biogás produzido migra em sentido inverso ao do fluxo de substrato, não sendo provável que afecte as reacções de degradação subsequentes. Num sistema ascendente com separação de biogás em cada andar, este não afecta a degradação nos andares superiores.

Segundo LETTINGA (1995), os processos segmentados favorecem as condições ambientais óptimas para a degradação de intermediários, o que é especialmente importante no tratamento de efluentes complexos. Este autor refere que é de esperar que um processo segmentado, cujo comportamento hidráulico se aproxima do fluxo pistão, seja mais eficiente do que um processo com um único compartimento. LETTINGA *et al.* (1997 a), preconizam que a sequência dos vários módulos deve ser optimizada e flexível, de acordo com o tipo de efluente a tratar, sendo aconselhável uma combinação de sistemas UASB, EGSB e filtros. Para efluentes contendo sólidos, o primeiro módulo deve ser capaz de remover esses sólidos realizando a hidrólise e a acidogénese, mas não a metanogénese. Para efluentes contendo lípidos, tais como os das indústrias de lacticínios, LETTINGA *et al.* (1997 a) refere que no primeiro módulo se deve permitir a remoção da emulsão lipídico-proteica presente nestes efluentes, bem como a acidificação dos componentes mais facilmente biodegradáveis.

Embora existam na literatura algumas referências a processos segmentados, a aplicação ao caso dos digestores de leito fixo não é muito vasta. EL-SHAFIE E BLOODGOOD (1973) estudaram a degradação dum efluente sintético complexo num sistema de leito fixo segmentado em seis andares e CHEUNG *et al.* (1986) estudaram um sistema de leito fixo segmentado em três andares aplicado ao tratamento de um efluente lácteo sintético, tendo

efectuado observações microscópicas da população microbiana instalada em cada andar. Também ARROJA (1993) estudou a operação dum digestor de leito fixo horizontal, segmentado em cinco andares, no tratamento de um efluente sintético contendo glucose como fonte de carbono. Em nenhum destes trabalhos se comparou a operação com um sistema de um só andar, nem se caracterizou a biomassa desenvolvida em termos físicos ou biológicos.

HARPER E POHLAND (1987) consideraram que a remoção do biogás formado nos primeiros estágios da degradação é um factor de protecção contra o efeito de eventuais produtos gasosos tóxicos tais como sulfureto, ar e amoníaco, favorecendo as condições para a metanogénese nos últimos andares. Estes autores concluíram ainda que a remoção do biogás afectava o ambiente em hidrogénio, mantendo-o em níveis baixos e favorecendo a degradação do acetato e do propionato.

VAN LIER *et al.* (1994) constatarem que a aplicação de um processo segmentado era benéfica para a estabilidade do tratamento termofílico e verificaram que, nos últimos compartimentos, a concentração de AGV e a pressão parcial de hidrogénio eram muito baixas. Referem a possibilidade de aplicar cargas orgânicas extremas de 50 a 100 kg CQO/m³.dia com 90 a 95% de eficiência e de suportar cargas volumétricas de biogás até 50 m³/m³reactor.dia, sem “washout” significativo de biomassa. Estes autores referem a importância de preservar a segregação das várias populações ao longo do digestor, salientando que tal é mais eficientemente conseguido num processo termofílico do que num mesofílico.

GROBICKI E STUCKEY (1991) também referem a operação dum digestor horizontal segmentado com anteparos e constatarem que o ácido fórmico era um importante intermediário nestes processos.

A biomassa desenvolvida em digestores segmentados não tem sido caracterizada em detalhe na maioria desses trabalhos. Alguns autores referem a existência de segregação, apenas com base nas curvas de degradação de substratos. Uma vez que o processo envolve reacções sequenciais, o facto de determinados intermediários não serem detectados, não significa que eles não sejam formados e consumidos.

NACHAIYASIT E STUCKEY (1995) estudaram a resposta microbiana de um digestor horizontal segmentado, a variações nas condições operatórias, nomeadamente temperatura e tempo de retenção hidráulico, mas não utilizaram métodos para caracterização microbiana directa. A análise baseou-se na distribuição dos intermediários do processo ao longo do reactor, nomeadamente dos ácidos gordos voláteis.

HARPER E POHLAND (1997) utilizaram a microscopia electrónica de varrimento para identificar os tipos mais abundantes de bactérias presentes em sistemas de leito fixo segmentados com diferentes configurações. Baseados em comparações com dados morfológicos da literatura, identificaram 3 tipos de cocos, 2 tipos de bastonetes e 1 tipo de bactérias filamentosas e determinaram a proporção de cada grupo de bactérias em cada configuração de digestor. Concluíram que os bastonetes e os cocos diminuía com o aumento do tempo de retenção hidráulico e que a proporção de bactérias filamentosas aumentava. Numa configuração de reactor com recirculação de biogás onde prevalecia o efeito de mistura, a distribuição espacial das populações era mais uniforme do que numa configuração com separação de biogás em que observaram uma estratificação e localização de culturas mais especializadas em diferentes secções do digestor.

VAN LIER *et al.* (1996) no seu trabalho com digestores segmentados do tipo manto de lamas, concluíram que a degradação segmentada conduzia a uma segregação da biomassa em termos das suas características físicas e biológicas. A caracterização da biomassa foi baseada na determinação de actividades metanogénicas individualmente em acetato, propionato e butirato

No processo de degradação anaeróbia, os diferentes grupos bacterianos envolvidos relacionam-se pela sua especificidade trófica e a selecção microbiana é essencialmente determinada pelas condições operatórias como o pH, a temperatura, a composição do substrato e a carga orgânica e hidráulica que afectam o comportamento fisiológico das bactérias e as suas propriedades físicas tais como o tamanho e a densidade dos agregados (MORGAN *et al.*, 1991). No entanto, a configuração do digestor, dado que pode induzir a acumulação de diferentes intermediários também afecta a selecção e distribuição microbianas. A competição entre diversos géneros de bactérias para o mesmo substrato pode ser promovida pela imposição de determinadas condições operatórias. Por exemplo

Methanosaeta compete com *Methanosarcina* para baixas concentrações de acetato, já que possui uma constante de afinidade mais baixa. Contudo, para elevadas concentrações de acetato, *Methanosarcina* é dominante. Também *Methanospirillum* e *Methanobacterium* competem para o H_2 , sendo *Methanospirillum* dominante para baixas concentrações (TOMEI *et al.*, 1985).

O estudo das populações microbianas de digestores anaeróbios laboratoriais está dependente da utilização de métodos analíticos adequados para análise de rotina, que não necessitem de quantidades elevadas de biomassa. No **sub-capítulo 2.4.1** do capítulo de Introdução foram referidos alguns métodos utilizados na caracterização da biomassa em digestores anaeróbios.

O estudo da resposta microbiana a variações nas condições operatórias tem sido alvo de alguns trabalhos referidos na literatura. HATTINGH *et al.* (1967) acompanharam a evolução da população microbiana presente num digestor anaeróbio durante a fase de adaptação a um substrato sintético, utilizando a técnica do número mais provável (NMP) e concluíram que, mesmo sessenta dias após o início da operação, a população microbiana apresentava um comportamento dinâmico. ANDERSON *et al.* (1994) estudaram a variação da população microbiana durante o arranque dum sistema de tratamento anaeróbio em duas fases. Utilizaram a contagem directa e a técnica do número mais provável (NMP). ZHANG E NOIKE (1994) utilizaram a mesma metodologia para estudar o efeito do tempo de retenção hidráulico na eficiência e na população microbiana dum processo anaeróbio de mistura completa e MORGAN *et al.* (1991) tentaram avaliar a influência da configuração do digestor na população anaeróbia estabelecida. Utilizaram a técnica NMP e a contagem directa, e concluíram que a configuração do digestor não influenciou significativamente o número de bactérias metanogénicas, não metanogénicas e acidogénicas na fase de arranque. INCE *et al.*, (1997) utilizaram as mesmas técnicas para caracterizar a população microbiana dum digestor com separação e recirculação de biomassa por meio de um sistema membranas de ultrafiltração, durante a fase de arranque. Concluíram que a percentagem de bactérias metanogénicas autofluorescentes aumentou durante o período de arranque, e que em 40 dias se atingiram elevadas eficiências de remoção de CQO. INCE *et al.* (1995) utilizaram a medida da actividade metanogénica específica para determinar a carga orgânica máxima possível a aplicar em digestores anaeróbios, durante a fase de arranque.

HENRY *et al.* (1996) estudaram a degradação de solventes orgânicos em digestores anaeróbios do tipo híbrido e caracterizaram evolutivamente o consórcio anaeróbio desenvolvido pela medição da actividade metanogénica específica em substratos individuais, directos e indirectos da metanogénese.

Nos filtros anaeróbios de fluxo ascendente existe uma maior concentração de biomassa na base do reactor (DAHAB E YOUNG, 1982, ALVES *et al.*, 1997 b). De acordo com dados experimentais de VEIGA *et al.* (1994), em determinadas condições experimentais a actividade metanogénica específica média da biomassa na base parece também ser superior à da biomassa presente em secções superiores. Em geral a concentração de substrato diminui acentuadamente a seguir à entrada, mantendo-se em níveis baixos ao longo da altura do reactor. Este tipo de comportamento sugere que a degradação ocorre essencialmente na base do digestor. No entanto, o tipo de comportamento hidrodinâmico também influencia a forma dos perfis de substrato.

A constatação destes factos conduziu a experiências com a operação de filtros anaeróbios multialimentados lateralmente, no sentido de aumentar a concentração de biomassa “activa” ao longo de todo o reactor. Experiências anteriores com um filtro anaeróbio laboratorial permitiram concluir que a eficiência de remoção com a alimentação múltipla era superior à obtida com uma alimentação única na base (+6% e +4%, respectivamente, para alimentação dupla e tripla) (ALVES, 1992). VEIGA *et al.* (1994) concluíram que num filtro anaeróbio com alimentação dupla, o perfil de sólidos não decrescia tão acentuadamente ao longo da altura como num filtro monoalimentado na base, e que a actividade metanogénica média da biomassa era superior em todas as secções do digestor multialimentado relativamente ao mono-alimentado.

Num processo segmentado, a alternativa de adicionar substrato fresco à entrada de cada andar, face à adição de todo o substrato na base do digestor pode ser justificada por dois aspectos: não ultrapassar um limiar mínimo de pH no primeiro andar por excesso de carga e aumentar a razão carbono/azoto que é progressivamente reduzida ao longo dos vários andares num processo segmentado mono-alimentado. Contudo, a diminuição do tempo de retenção que essas adições impõem pode ser limitante para a eficiência do sistema.

3.2 Objectivos

O objectivo do trabalho apresentado neste capítulo foi comparar a operação de um filtro anaeróbio de fluxo ascendente segmentado em três andares com uma configuração tradicional com um único andar, no tratamento de um efluente solúvel facilmente degradável. Numa primeira fase do trabalho operaram-se ambas as configurações com uma única alimentação na base e posteriormente procedeu-se a uma alimentação múltipla na entrada de cada andar do filtro segmentado, mantendo idênticas as condições operatórias de ambos os digestores. O objectivo foi comparar ambas as configurações em termos dos seguintes parâmetros:

- eficiência de remoção de CQO;
- produção de metano;
- distribuição de vários grupos tróficos do consórcio anaeróbio estabelecido por medida da actividade específica das bactérias acidogénicas, sintróficas e metanogénicas;
- características físicas da biomassa, nomeadamente o tamanho e a rugosidade da superfície dos agregados formados e a sua velocidade de sedimentação;
- características hidrodinâmicas, por determinação e tratamento matemático da função distribuição dos tempos de residência.

3.3 Materiais e Métodos

3.3.1 Instalação experimental

Os dois filtros anaeróbios foram construídos em vidro acrílico e estão representados esquematicamente na Figura 3.1. Uma das configurações foi segmentada em três andares (FAII) e a outra por ser uma configuração tradicional de modo ascendente (FAI) foi utilizada como controlo. O volume inicial de líquido nos digestores foi de 14.2 e de 17.7 litros em FAI e FAII respectivamente e ambas as configurações possuíam o mesmo volume de enchimento, constituído por anéis de *Raschig* em PVC com 21 mm de tamanho. A área específica do leito era de $230 \text{ m}^2/\text{m}^3$ e a porosidade de 92.5%. No digestor segmentado colocou-se, um separador gás-líquido-sólido em cada andar, que permitiu a canalização do biogás produzido para tubos laterais, no topo dos quais se colocou-se uma secção de alargamento para facilitar a libertação do biogás. O volume de biogás produzido em cada andar de FAII e em FAI foi medido individualmente utilizando medidores de gás por impulsos semelhantes aos descritos por VEIGA *et al.* (1990) e baseados nos trabalhos de MOLETTA E ALBAGNAC (1982) e de MOTA *et al.* (1987), que se encontram esquematicamente representados na Figura 3.1. Cada digestor possuía várias portas de amostragem que permitiram retirar amostras líquidas e sólidas a várias alturas. A distância entre as várias portas de amostragem foi de 11 cm em FAI e de 6 cm em FAII.

Foram realizados ensaios preliminares para avaliar a eficiência da separação do biogás em cada andar. Estes ensaios encontram-se descritos no **Apêndice A**. Numa tentativa de aplicar a espectrometria de massa à medição da composição do biogás formado em FAI e nos três andares de FAII, construiu-se um circuito para conduzir o biogás ao espectrómetro de massa que se encontra descrito no **Apêndice B**.

O substrato foi armazenado a 4°C e a temperatura de operação foi mantida em $37\pm 1^\circ\text{C}$, por meio de circulação de água quente numa camisa externa.

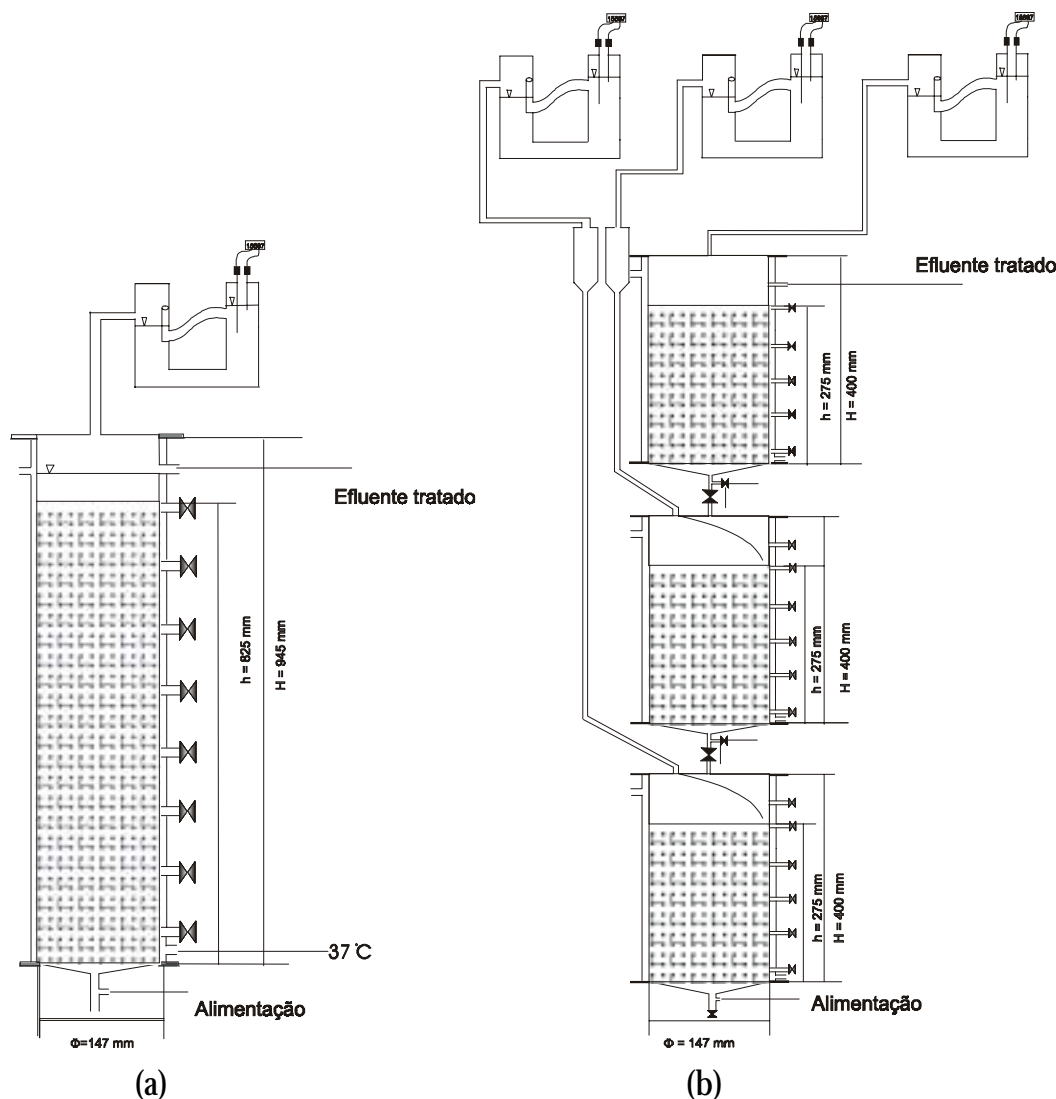


Figura 3.1 Representação esquemática de FAI (a) e de FAII (b).

3.3.2 Substrato e inóculo

O substrato consistiu num efluente lácteo sintético, obtido por diluição de leite magro comercial com água da rede. Foram adicionados 5 g de NaHCO_3/L para manter a alcalinidade em valores adequados ($2500\text{-}5000 \text{ mgCaCO}_3/\text{L}$). Até ao dia 343 não foram adicionados nutrientes. A partir do dia 343, passaram-se a adicionar macro e micronutrientes. A solução de macronutrientes foi adicionada na proporção de 0.6 mL/gCQO alimentado e a solução de micronutrientes adicionou-se na quantidade fixa de 1 mL/L . Antes da adição de nutrientes o substrato era deficiente em fósforo, sendo a razão

CQO/N/P igual a 100/5/0.04. Após a adição de nutrientes a razão CQO/N/P passou a ser 100/5/0.43. A composição das soluções de nutrientes adicionadas foi a seguinte:

Macronutrientes - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 30.2 g/L; KH_2PO_4 : 28.3 g/L; KCl : 45 g/L. Esta solução foi adicionada numa quantidade de 0.6 mL por grama de CQO alimentado.

Micronutrientes - $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 2 g/L; H_3BO_3 : 0.05 g/L; ZnCl_2 : 0.05 g/L; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0.038 g/L; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 0.5 g/L; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 0.05 g/L; $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 0.09 g/L; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 2 g/L; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 0.092 g/L; $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 0.164 g/L; EDTA: 1g/L, Resazurina: 0.2 g/L; HCl 37%: 1 mL/L. A composição desta solução baseou-se no trabalho de ZEHNDER *et al.* (1980).

O inóculo foi obtido de um digestor anaeróbio de tratamento de lamas integrado na estação de tratamento de águas residuais de Cambados, Maia. Adicionaram-se a ambos os digestores 3.6 L de lamas com um teor de sólidos suspensos totais de 40 g/L, cuja fracção volátil era 51.5%. No digestor segmentado este inóculo foi distribuído igualmente pelos três andares.

3.3.3 Controlo analítico de rotina

A operação dos digestores foi monitorizada por determinações periódicas, 2 a 3 vezes por semana, da Carência Química de Oxigénio (CQO) total à entrada, e solúvel à saída de FAI e à saída de cada andar de FAII. Na corrente global de saída de FAI e de FAII a CQO total também foi determinada. Com a mesma periodicidade determinaram-se os caudais alimentados, os ácidos gordos voláteis (AGV) nas correntes de saída de FAI e de cada andar de FAII e o conteúdo em metano do biogás produzido em FAI e em cada andar de FAII. O volume de biogás produzido foi medido diariamente por leitura dos contadores de impulsos acoplados aos medidores de gás.

Em algumas fases da operação, após atingir estados (pseudo) estacionários procedeu-se a determinações de perfis de ácidos voláteis, CQO, sólidos voláteis (SV), azoto orgânico e azoto amoniacal ao longo da altura dos digestores. Estes perfis foram sempre determinados em duplicado em amostras retiradas em dois dias consecutivos.

Descrevem-se a seguir os métodos analíticos utilizados no decorrer do trabalho.

3.3.3.1 Carência química de oxigénio (CQO)

A análise de CQO solúvel (centrifugada durante 10 minutos a 15000 rpm) e total, foi realizada pelo método do refluxo fechado com titulação (STANDARD METHODS, 1989). O método baseia-se na oxidação da matéria orgânica presente na amostra com uma quantidade definida e em excesso de dicromato de potássio, em meio ácido. Após digestão durante 2 horas a 150 °C e arrefecimento, o excesso de dicromato de potássio é titulado com sulfato de ferro e amónio, utilizando um indicador de ferroína para detectar o ponto de viragem (indicado pela passagem de uma cor amarela-esverdeada para laranja-acastanhada). A concentração de matéria orgânica, expressa em mg O₂/L é calculada por:

$$\text{CQO (mg O}_2\text{ / L)} = \frac{(V_{t-\text{branco}} - V_{t-\text{amostra}}) \times 8000 \times M}{V_a} \quad (3.1)$$

em que:

V_{t-branco} é o volume de titulante gasto na titulação do branco

V_{t-amostra} é o volume de titulante gasto na titulação da amostra

M é a molaridade da solução titulante de Sulfato de Ferro e Amónio

V_a é o volume de amostra

3.3.3.2 Ácidos Gordos Voláteis (AGV)

Os AGV foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-*high performance liquid chromatography*) (Jasco, Japão). As condições de análise foram as seguintes:

Coluna: Chrompack (300x6.5 mm)

Fase móvel (eluente): H₂SO₄ 0.01N filtrado por membrana de porosidade 0.45 µm e desgasificado num banho de ultra sons (*Sonicor SC 52*) durante 5 minutos

Caudal de eluente : 0.7 mL/min

Temperatura de operação: 40°C

Detector :espectrofotométrico a λ=210 nm

As amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 15000 rpm e analisadas em seguida. Só excepcionalmente se preservaram as amostras por congelação para análise posterior.

Durante o decorrer de todo o trabalho relativo a esta dissertação fizeram-se calibrações periódicas em duas gamas de concentrações: 10-100 mg/L e 100-1000 mg/L. Calcularam-se

os erros associados ao declive e ordenada na origem, que se propagaram aos valores calculados. Verificou-se experimentalmente que os limites de detecção de cada ácido eram inferiores a 10 mg/L, e eram diferentes de ácido para ácido. Considerou-se que o limite superior do erro associado à ordenada na origem, da curva de calibração correspondente à gama de concentrações mais baixas, poderia representar o valor mínimo detectável. Assim no início do trabalho, as curvas de calibração e os limites de detecção foram os seguintes (Tabela 3.1):

Tabela 3.1 Curvas de calibração e limites de detecção na análise dos ácidos voláteis por HPLC.

ácido	gama de concentração (mg/L)	curvas de calibração Concentração (mg/L)=	limite de detecção (mg/L)
lático	10-100	$(-3.00 \pm 5.45) + (1.11 \pm 0.10) \times 10^{-3} \times \text{área}$	2.4
	100-1000	$(9.77 \pm 23.6) + (9.70 \pm 0.52) \times 10^{-4} \times \text{área}$	
fórmico	10-100	$(2.29 \pm 4.27) + (5.63 \pm 0.37) \times 10^{-4} \times \text{área}$	6.6
	100-1000	$(4.89 \pm 9.28) + (5.33 \pm 0.10) \times 10^{-4} \times \text{área}$	
acético	10-100	$(1.91 \pm 2.23) + (9.40 \pm 0.39) \times 10^{-4} \times \text{área}$	4.1
	100-1000	$(3.99 \pm 4.92) + (8.90 \pm 0.10) \times 10^{-4} \times \text{área}$	
propiónico	10-100	$(3.17 \pm 0.31) + (9.95 \pm 0.05) \times 10^{-4} \times \text{área}$	3.5
	100-1000	$(5.57 \pm 3.41) + (9.38 \pm 0.06) \times 10^{-4} \times \text{área}$	
butírico	10-100	$(3.49 \pm 4.75) + (6.10 \pm 0.46) \times 10^{-4} \times \text{área}$	8.2
	100-1000	$(5.12 \pm 4.46) + (5.80 \pm 0.04) \times 10^{-4} \times \text{área}$	

Ao longo do tempo, e como consequência do desgaste da coluna, os limites de detecção foram aumentando e, no final do trabalho, situavam-se em 22.5, 15.4, 10.6, 22.5 e 26.1 mg/L para lactato, formato, acetato, propionato e butirato, respectivamente.

3.3.3.3 Sólidos voláteis (SV)

A determinação dos SV nos testes de actividade foi feita por diferença entre o peso da amostra seca a 103-105 °C até atingir peso constante, e calcinada a 550 °C (STANDARD METHODS, 1989). As determinações de sólidos voláteis foram sempre feitas em triplicado ou quadruplicado.

Os sólidos suspensos voláteis (SSV) na corrente de saída foram estimados pela diferença entre a CQO total e solúvel. A conversão entre a CQO e os SSV foi baseada na consideração de que a biomassa pode ser expressa pela fórmula empírica $C_5H_7O_2N$, correspondendo 1 g SSV a 1.42 g de CQO.

3.3.3.4 Percentagem de metano no biogás

Inicialmente mediu-se a composição do biogás produzido nos digestores por espectrometria de massa, mas esta metodologia revelou-se problemática, pelo que foi abandonada. No **Apêndice B** estão descritos em pormenor os problemas que se encontraram na tentativa de aplicação da espectrometria de massa.

Após essa tentativa, a determinação do gás metano foi realizada por cromatografia gasosa (GC), utilizando um cromatógrafo *Pye Unicam GCD* com um detector de ionização de chama. As condições de análise foram as seguintes:

Coluna: Chrompack Haysep Q (80-100mesh)

Temperatura da coluna: 40°C

Temperatura do injector: 120°C

Temperatura do detector: 130°C

Gás de arraste: Azoto

Caudal do gás arraste: 30mL/min

Sempre que se procedia a uma análise injectava-se uma mistura gasosa contendo metano numa percentagem semelhante à da amostra. As injeções das amostras e das misturas de calibração foram sempre feitas em triplicado. O volume injectado era de 0.5 mL.

3.3.3.5 Azoto total e amoniacal

O azoto amoniacal foi determinado pelo método titulimétrico com destilação prévia, utilizando um destilador automático *Tecator Kjeltac 1026*. A um volume definido de amostra, normalmente 10 mL, foi adicionado NaOH, procedendo-se, de seguida a uma destilação. O destilado, contendo o NH_3 era recolhido em 25 mL de ácido bórico a 4%, sendo posteriormente titulado com H_2SO_4 0.02 N. O ponto final da titulação era indicado por uma mudança de cor verde para cinzento. A concentração de azoto amoniacal foi calculada pela seguinte expressão:

$$\text{azoto amoniacal (mg N - NH}_4\text{ / L)} = \frac{(V_{t-\text{amostra}} - V_{t-\text{branco}}) \times 14 \times N}{V_a} \quad (3.2)$$

onde

$V_{t-\text{amostra}}$ representa o volume de titulante gasto na titulação da amostra

$V_{t-\text{branco}}$ representa o volume de titulante gasto na titulação do branco realizado nas mesmas condições da amostra mas utilizando água ultra-pura

V_a representa o volume de amostra

N representa a Normalidade do titulante

14 representa a massa atômica do azoto

O azoto orgânico foi determinado por diferença entre o azoto *Kjeldhal* e o azoto amoniacal. Na determinação do azoto *Kjeldhal* foi realizada uma digestão da amostra em meio ácido e na presença de um catalisador. A 10 mL de amostra adicionavam-se 10 mL de H_2SO_4 concentrado e uma pastilha de catalisador de Selénio (*Tecator S/3.5*). Esta mistura era realizada directamente em tubos de digestão que eram posteriormente colocados num bloco pré-aquecido a 350-400 °C (*Tecator system 1007/6*). Após aparecimento de fumos esbranquiçados prolongava-se a digestão cerca de ½ hora. Os tubos eram arrefecidos e, seguidamente, procedia-se à determinação do azoto amoniacal tal como descrito anteriormente. Sempre que se realizavam digestões, 2 dos 6 tubos eram destinados a ensaios em branco, utilizando água ultra-pura. Os tubos de digestão tinham de ser previamente lavados com H_2SO_4 20% seguindo-se lavagem repetida com água ultra-pura e secagem completa. Todos os ensaios de azoto amoniacal e azoto *Kjeldhal* foram realizados em duplicado.

3.3.4 Caracterização da biomassa

3.3.4.1 Recolha, separação e quantificação das fracções de biomassa

No final da operação separaram-se as fracções de biomassa aderida e oclusa retidas em ambos os digestores. A biomassa oclusa foi considerada a fracção que se desprendia do suporte quando este era espalhado num banho de água destilada agitado manualmente com movimentos giratórios de sentido alternado durante 1 minuto. Após separação e centrifugação, o volume total e o conteúdo em sólidos voláteis foi determinado. Este procedimento fez-se na presença de N_2/CO_2 (80:20), evitando o contacto da biomassa com

o ar, dado que seria posteriormente utilizada para efectuar testes de actividade metanogénica. Após decantação e centrifugação a 6000 rpm, durante 10 minutos, a biomassa foi ressuspensa em tampão anaeróbio e foram medidos o volume total e a concentração de sólidos voláteis. Após armazenamento a 4°C e com a maior brevidade possível, foram iniciados os testes de actividade metanogénica específica.

Depois de removida a fracção oclusa, o suporte foi imerso em NaOH 0.1 N, e mantido em agitação a 100 rpm e 37 °C, durante 12 horas, seguindo-se uma sonicação num banho (*Sonicator SC 52*) durante 10 minutos (DONLON, 1992). Foi determinado o volume final e o conteúdo em sólidos voláteis.

3.3.4.2 Testes de actividade metanogénica

A actividade metanogénica específica da biomassa oclusa desenvolvida durante a experiência foi determinada de acordo com o método desenvolvido no Departamento de Microbiologia da Universidade Nacional da Irlanda em Galway sob supervisão da Professora Emer Colleran (COLLERAN *et al.*, 1992) e cujos principais contributos se devem a REYNOLDS (1986), CONCANNON *et al.* (1988) e COATES *et al.*, (1996). O método baseia-se na medição do aumento ou decréscimo de pressão, em frascos selados, resultantes da produção de biogás aquando da degradação de substratos líquidos ou gasosos respectivamente. Para medir a variação de pressão utilizam-se transdutores de pressão (*Centrepints Electronics, Galway, Irlanda*) com um sensor de diafragma (*nº 303-343, R.S. Components Ltd., Corby, Northants, Inglaterra*), que mede aumentos e decréscimos de pressão e tem a capacidade de medir variações de ± 2 atmosferas ($0 \pm 202.6 \text{ KPa}$), através de uma gama de -200 a +200 mV. O sensor está ligado a um painel digital (*nº 258-041, R.S. Components Ltd., Corby, Northants, Inglaterra*) e é alimentado por um transformador de 9V DC.

O transdutor portátil permite adaptar uma agulha e as leituras em mV são obtidas por inserção da agulha nos frascos selados (Figura 3.2). Em cada leitura perdem-se cerca de 30 µl de biogás, o que representa uma fracção mínima do biogás total produzido num teste, não sendo por isso necessário utilizar um factor de correcção. Imediatamente após as últimas medidas de pressão, o biogás formado durante o teste é analisado, é medido o volume de vazio de cada frasco e são medidos os sólidos voláteis contidos em cada frasco.

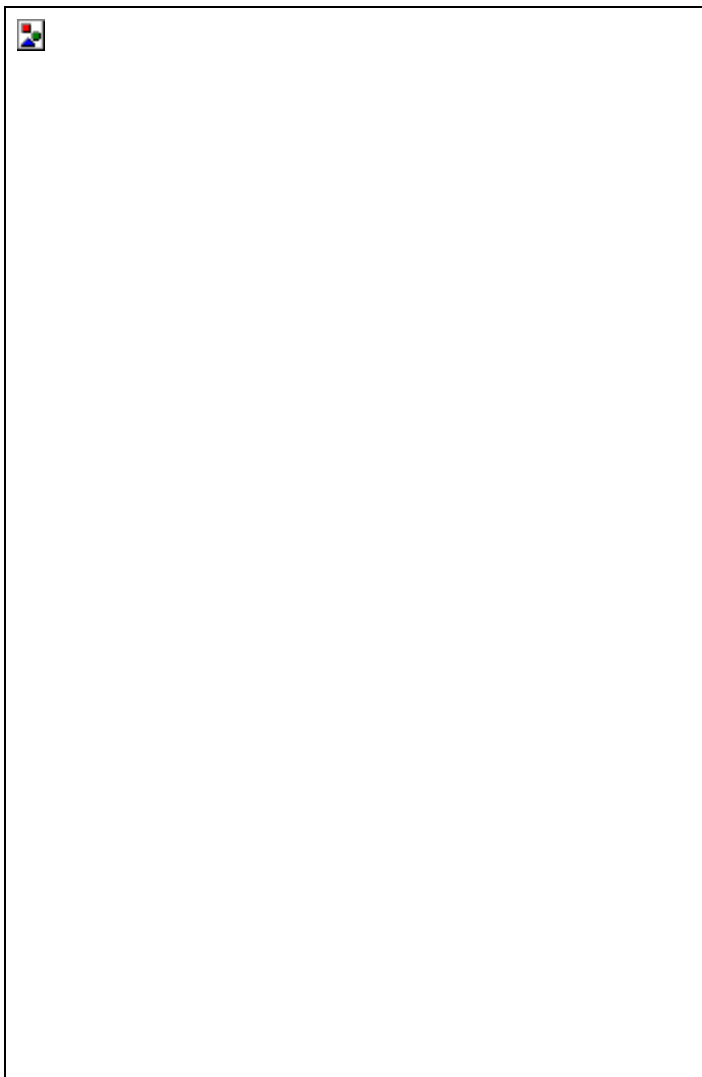


Figura 3.2 Transdutor de pressão portátil utilizado neste procedimento.

Meio basal (tampão anaeróbio)

O meio basal utilizado nos testes de actividade foi preparado de acordo com o método de SHELTON E TIEDJE (1984), inicialmente modificado por REYNOLDS (1986) e posteriormente por GEOGHEGAN (1989). Adiciona-se 1mL/L de uma solução de rezasurina (1g/L) e 0.5g/L de Cisteína-HCL a água destilada. Após ajuste do pH a um valor de 7-7.2, pela adição de NaOH ou HCL 8N, leva-se à ebulição até o indicador de resazurina mudar de cor rosa para incolor, indicando que está em condições anaeróbias. A ebulição deve ser lenta para impedir

que a cisteína se converta em cistina, composto tóxico para as populações microbianas que se pretendem caracterizar.

O meio é arrefecido em gelo, na presença de azoto e, quando se atinge uma temperatura de cerca de 40-50°C este gás é substituído por N₂/CO₂ (80/20) e adicionam-se 3.05g/L de bicarbonato de sódio.

Substratos líquidos

Os substratos líquidos utilizados foram acetato, propionato e butirato. Foi assim possível determinar a actividade metanogénica específica das bactérias metanogénicas acetoclásticas e a actividade metanogénica na presença de dois substratos indirectos representativos das bactérias acetogénicas produtoras de hidrogénio (sintróficas).

As soluções “*stock*” dos substratos líquidos foram preparadas em concentrações 100 vezes superiores às de trabalho. As soluções de acetato e propionato foram preparadas com uma concentração de 3 M e a de butirato com 1.5 M. Todas as soluções “*stock*” foram neutralizadas a pH 7, e armazenadas a 4 °C. Foi necessário reduzir a concentração de butirato relativamente aos outros substratos devido ao seu mais alto potencial metanogénico (2.5 moles de CH₄ são formadas por mole de butirato enquanto que acetato e propionato produzem 1 e 1.75 moles de CH₄ respectivamente).

Procedimento experimental e cálculo da actividade metanogénica (substratos líquidos)

Cada teste com substratos líquidos envolve ensaios em triplicado com cada um dos substratos líquidos e ainda um ensaio em branco, também em triplicado, num total de 12 frascos. O volume de trabalho é 12.5 mL e o volume total de 25 mL. A cada frasco, previamente “lavado” com N₂/CO₂ (80/20) adicionam-se, em condições anaeróbias estritas, volumes de biomassa e de tampão anaeróbio de tal modo que num volume total de trabalho de 12.5 mL a concentração de sólidos voláteis (SV) esteja compreendida entre 2 e 5 g/L, e preferencialmente próxima de 3 g/L. Os frascos são fechados com rolhas de borracha

butírica (*nº 2048-11800, Bello glass Inc., Vineland, N.M.*) e selados com cápsulas em alumínio (*nº 13214, Pierce, UK*).

Os frascos são aclimatizados a 37 °C com agitação a 150 rpm num agitador orbital (*Braun Certomat R*) durante uma noite, tal como sugerido por DOLFING E BLOEMEN (1985). Seguidamente adicionam-se 125 µL de substrato, excepto aos frascos relativos aos ensaios em branco. Após remoção do excesso de pressão devida à degradação de substrato residual, os frascos são incubados a 37 °C e a 150 rpm.

Após uma hora de incubação nessas condições, inicia-se a medição da pressão desenvolvida nos frascos (em *mV*). As leituras são repetidas com intervalos de 1 a 2 horas, dependendo da velocidade de produção, dando-se especial atenção à fase inicial, que é a considerada para cálculo da actividade metanogénica específica. O teste considera-se terminado quando a pressão deixar de variar, indicando que todo o substrato foi consumido.

Após a análise do biogás produzido, utilizando o método descrito no **sub-Capítulo 3.3.3.4**, página 112, determina-se o volume de espaço vazio de cada frasco, por injeção de uma quantidade conhecida de ar e por registo do correspondente aumento de pressão por mL de ar injectado (*mV/mL*). Este procedimento é realizado em triplicado para cada frasco. Por fim, determinam-se os sólidos voláteis presentes em cada frasco com a totalidade do conteúdo dos mesmos.

Os valores de *mV* medidos, são representados graficamente em função do tempo e calculam-se os respectivos declives na zona linear inicial, em *mV* por hora. Dividindo estes declives pelos valores de *mV/mL*, correspondentes ao aumento de pressão em *mV* por mL de ar injectado, exprimem-se os valores dos declives em mL de biogás produzido por hora (*mL/h*). A percentagem de metano presente no biogás produzido durante os testes foi determinada pela equação 3.3:

$$MP = \frac{(V_h + V_c)}{V_c} \times \%CH_4 \quad (3.3)$$

em que

V_h é o volume de gas inicialmente presente no frasco (volume de vazio do frasco)

V_c é o volume do biogás produzido durante o teste

%CH₄ é a percentagem de metano determinada no biogás contido em cada frasco no final do ensaio

sendo V_c e V_h calculados pelas equações 3.4 e 3.5, respectivamente:

$$V_c = \frac{\text{leitura final, mV}}{\text{mV / mL}} \quad (3.4)$$

$$V_h = \frac{\text{leitura em mV correspondente a 1 atm}}{\text{mV / mL}} \quad (3.5)$$

Multiplicando os mL de gás produzido numa hora por 24, pela percentagem de metano e pelo factor de calibração do transdutor (FC) e dividindo o resultado pelos sólidos voláteis, obtém-se o valor final da actividade metanogénica específica (equação 3.6)

$$\text{Actividade metanogénica específica} = \frac{\text{mL / h} \times 24 \times \text{MP} \times \text{FC}}{\text{SV}} \quad (3.6)$$

expressa em mL CH₄@PTN/gSV.dia. FC representa um factor de calibração de cada transdutor utilizado, e contempla a conversão dos valores para as condições normais de pressão e temperatura (PTN) (**Apêndice C**). Aos valores de actividade assim obtidos subtrai-se a actividade específica, calculada da mesma forma, para os brancos.

Substratos gasosos

Utiliza-se uma mistura de H₂/CO₂ (80/20 %v/v) como substrato para avaliar a actividade metanogénica hidrogenofílica (COATES *et al.*, 1996). Nos ensaios em branco relativos a este substrato gasoso, utiliza-se uma mistura inerte de N₂/CO₂ (80/20).

Procedimento experimental e cálculo da actividade metanogénica (substratos gasosos)

Neste teste o volume de trabalho é de 12.5 mL e o volume total de 70 mL. Os procedimentos de adição de biomassa, tampão e aclimatização a 37 °C durante uma noite são semelhantes aos descritos no caso dos substratos líquidos. A conversão de H₂/CO₂ a

CH₄ é acompanhada de um decréscimo de pressão que corresponde à transformação de 5 moles de H₂ e CO₂ em apenas uma mole de metano, segundo a reacção 2.12:



Pressurizam-se os frascos com a mistura reagente a 1 bar e segue-se a diminuição de pressão ao longo do tempo. O decréscimo de pressão obtido, é directamente convertido em mL de CH₄ produzidos em cada ponto de registo de pressão, pela expressão 3.8:

$$\text{Volume de CH}_4 (\text{mL}) = \frac{P_{(n-1)} - P_{(n)}}{mV / \text{mL} \times 4} \quad (3.8)$$

onde $P_{(n-1)}$ e $P_{(n)}$ correspondem, respectivamente, aos mV lidos nos tempos $n-1$ e n . A produção total de gás corresponde ao somatório do volume de CH₄ produzido em cada ponto.

A taxa inicial de produção de CH₄ (mL/h) obtém-se por determinação do declive inicial da representação gráfica do volume de CH₄ produzido ao longo do tempo. A actividade metanogénica hidrogenofílica específica determina-se pela equação 3.9:

$$\text{Actividade metanogénica específica} = \frac{\text{mLCH}_4 / \text{h} \times 24 \times \text{FC}}{\text{SV}} \quad (3.9)$$

expressa em $\text{mLCH}_4 @ \text{PTN.} / \text{gSV.dia.}$

Os valores finais são obtidos após subtracção dos valores de actividade calculados do mesmo modo para os ensaios em branco.

3.3.4.3 Testes de actividade acidogénica

Nos testes de actividade acidogénica determinou-se a velocidade inicial de consumo de lactose. O volume de trabalho foi de 50 mL e o volume total dos frascos foi de 120 mL. O meio basal foi previamente descrito no **sub-Capítulo 3.3.4.2**, página 114 desta dissertação. O substrato foi lactose na concentração inicial de 10 mM. Após aclimatização da biomassa durante uma noite a 37 °C e em agitação a 150 rpm, adicionou-se 0.5 mL de uma solução “stock” de lactose 1 M. Retirou-se imediatamente a primeira amostra, correspondendo ao

tempo inicial. As amostras retiradas ao longo do tempo eram imediatamente colocadas em gelo, centrifugadas a 15 000 rpm durante 10 minutos e congeladas. A lactose foi analisada utilizando um teste enzimático específico para lactose/glucose (*Boehringer-Mannheim/986119*). No final do ensaio, determinaram-se os sólidos voláteis, individualmente em cada frasco. Os ensaios foram realizados em duplicado.

3.3.4.4 Observações microscópicas

Para observar o aspecto dos agregados, utilizou-se um microscópio electrónico de varrimento (*Leica, Cambridge, S360*). As amostras foram fixadas com uma solução de glutaraldeído 3%(v/v) em tampão cacodilato pH 7.2. Seguidamente foram desidratadas por lavagem com soluções de etanol de concentração crescente (10, 25, 50, 75, 90 e 100%) e armazenadas num exsiccador até ao momento de observação.

A presença de bactérias metanogénicas auto fluorescentes foi detectada por visualização num microscópio óptico de fluorescência (*Zeiss, Axioscope*) a um comprimento de onda de 420 nm.

3.3.4.5 Caracterização física dos agregados

Os agregados desenvolvidos nas várias secções de ambos os digestores foram caracterizados em termos de velocidade de sedimentação, tamanho e rugosidade da superfície.

A velocidade de sedimentação foi determinada por medição directa do tempo que uma partícula demorava a percorrer uma determinada distância quando livremente colocada num meio aquoso. Este procedimento foi realizado para 50 partículas por amostra, sendo considerado o valor médio e o intervalo de confiança (95%) associado.

O tamanho dos agregados foi medido pela área projectada, utilizando um sistema de análise de imagem constituído por uma câmara de vídeo *Sony AVC-D5CE CCD* (Japão) adaptada a uma lupa binocular *Olympus SZ40* (Japão). As imagens analógicas foram digitalizadas numa matriz com 512x512 “*pixels*” com 256 cores, sendo simultaneamente visualizadas num monitor *Sony PVM 1440QM*. As imagens digitalizadas foram armazenadas em formato BMP. Para cada amostra analisaram-se entre 100 e 250 partículas.

Foi desenvolvido um programa em MATLAB (*The Mathworks, Inc., USA*) chamado Imago (AMARAL *et al.*, 1997). O MATLAB inclui funções de cálculo numérico e de visualização e rotinas específicas como a de processamento de sinal ("*Signal Processing Toolbox*"), de identificação de sistemas ("*System Identification Toolbox*"), de processamento de imagem ("*Image Processing Toolbox*") e de tratamento estatístico ("*Statistic Toolbox*"), que, conjugadas permitem a análise e processamento de imagens de forma flexível. Cada imagem é representada por uma matriz em que cada elemento representa um "*pixel*" dessa imagem.

Para determinar as dimensões fractais utilizou-se o método da contagem das caixas ("*box counting*"). Este baseia-se na aplicação de uma grelha sobre a imagem digitalizada do objecto ("*pixels*" brancos) e na contagem do número de caixas que cabem inteiramente dentro do objecto, do número de caixas da fronteira (contendo "*pixels*" brancos e pretos) e inteiramente fora do objecto ("*pixels*" pretos). O número de caixas de tamanho S necessário para cobrir uma superfície $N(S)$ é proporcional a S^{-D} , em que D é a dimensão fractal.

Podem usar-se relações área *versus* diâmetro de *Feret* ou área *versus* perímetro. No primeiro caso calcula-se a área e o diâmetro de *Feret* para cada tamanho de caixa. O diâmetro de *Feret* é o máximo diâmetro medido para o maior tamanho de caixa em 8 direcções (22.5°, 45°, 77.5°, 90°, 112.5°, 135°, 167.5°, e 180°). No segundo caso deve calcular-se a área e o perímetro para cada tamanho de caixa e pela representação $\text{Log}(\text{área})$ versus $\text{Log}(\text{perímetro})$, calcula-se a dimensão fractal. O tamanho das caixas é escolhido automaticamente pelo programa de modo a minimizar as variações da dimensão fractal com o tamanho dos objectos.

3.3.5 Distribuição de Tempos de Residência (DTR)

Os estudos de hidrodinâmica foram realizados por determinação da função distribuição dos tempos de residência baseada na técnica estímulo-resposta (LEVENSPIEL, 1972). O traçador utilizado foi cloreto de lítio que se injectou nos digestores, segundo uma função do tipo "impulso de Dirac". Injectaram-se 2 mL com 20 g Li^+/L num intervalo de tempo o mais curto possível, utilizando uma seringa de 2.5 mL. As amostras foram recolhidas e refrigeradas num amostrador automático *New Brunswick Scientific, Mx Biosampler (USA)*. Após

centrifugação a 6000 rpm, o litio foi analisado num fotómetro de chama *ATS, 200 MKI* (Suiça).

Os parâmetros dos modelos de escoamento testados foram determinados por regressão não linear, pelo método *Levenberg Marquardt* (MAQUARDT, 1963), utilizando o conjunto de rotinas de optimização do programa MATLAB (“*Optimization Toolbox*”, *The Mathworks, Inc.*, USA). No **Apêndice D** estão descritas as principais rotinas utilizadas no cálculo, bem como a dedução das equações dos modelos de escoamento utilizados.

3.3.6 Modo de operação

A operação dos dois digestores (FAI-digestor convencional, FAII-digestor segmentado) prolongou-se durante 965 dias sem interrupção. A operação foi dividida em quatro períodos operatórios que se resumem na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 Esquema do modo de operação dos digestores.

Tempo (dias)	Observações	Concentração de substrato (mg CQO/L)	TRH (dias)
0-343	operação sem nutrientes	3000	1-3
343-670	TRH constante, concentração crescente	3000-12000	2
670-908	concentração constante, TRH decrescente, alimentação distribuída em FAII, alimentação única em FAI	9000	2-0.44
908-965	alimentação única em FAII, alimentação distribuída em FAII	9000	0.44

Durante os primeiros 343 dias de operação, não se adicionaram nutrientes e são apresentados os resultados de exploração dos digestores nessas condições. Seguidamente adicionaram-se nutrientes, sendo comparada a operação com e sem nutrientes, em termos dos parâmetros operatórios correntes tais como eficiência de remoção de CQO, AGV à saída e produção de biogás.

Numa segunda fase operaram-se os digestores com uma alimentação na base e com tempo de retenção constante igual a dois dias. A concentração de substrato foi de 3, 6, 9 e 12 g CQO/L. Para a concentração de 3 e 9 g CQO/L, e uma vez atingido o estado (pseudo) estacionário, procedeu-se à determinação dos perfis de CQO, AGV e SV, ao longo da altura dos digestores. Avaliou-se também em três alturas dos digestores (base, meio e topo em FAI, 1º, 2º e 3º andares de FAII) a actividade metanogénica específica em substratos directos e indirectos da metanogénese (acetato, H_2/CO_2 , propionato e butirato), bem como a actividade acidogénica em lactose. Nas mesmas amostras determinaram-se as características físicas dos agregados (tamanho, velocidade de sedimentação e rugosidade da superfície).

Após atingir, na saída do primeiro andar de FAII, um pH inferior a 6.5, optou-se por não sobrecarregar mais este andar e proceder a aumentos de carga por adição de uma segunda corrente na entrada do segundo andar até que, à saída deste andar, o pH também estivesse no valor limite pré estabelecido, procedendo-se a uma nova adição lateral à entrada do terceiro andar. O tempo de retenção global foi assim sucessivamente reduzido desde 2 dias até 16 horas. Seguidamente, reduziu-se o tempo de retenção até 10 horas por aumento de todos os caudais alimentados. FAI funcionou como digestor de controlo, operando de modo tradicional com uma única alimentação na base e com os mesmos tempos de retenção e concentração de entrada de FAII. Durante este estudo, a concentração de entrada manteve-se constante, em 9 g CQO/L. Nestas condições (alimentação distribuída em FAII e alimentação única em FAI), determinaram-se também as características biológicas e físicas da biomassa.

Antes de finalizar a operação operou-se FAII com uma alimentação única na base e distribuiu-se a alimentação em FAI.

3.4 Resultados e discussão

Os resultados serão apresentados numa perspectiva cronológica, evidenciando-se a comparação entre as duas configurações.

3.4.1 Operação sem adição de nutrientes

Durante os primeiros 343 dias operaram-se os filtros anaeróbios sem adição de qualquer nutriente. Esta opção foi baseada na hipótese de que o efluente lácteo sintético utilizado pudesse conter os nutrientes necessários ao desenvolvimento das bactérias envolvidas no processo. O arranque dos digestores foi realizado em contínuo com um tempo de retenção hidráulico de 5 dias e uma concentração de substrato de cerca de 1200 mg CQO/L e durou aproximadamente 1 mês. Na Figura 3.3 estão representados os valores da carga orgânica aplicada, da eficiência de remoção, do tempo de retenção hidráulico, da concentração à entrada e dos ácidos voláteis na corrente de saída em FAI e FAII durante este período operatório. Na Tabela 3.3 e na Tabela 3.4 estão representados os valores médios de estado (pseudo) estacionário obtidos durante esse período em FAI e FAII respectivamente. A concentração de substrato manteve-se constante em cerca de 3000 mg CQO/L e o tempo de retenção hidráulico inicial foi de 3 dias. Em FAI, o tempo de retenção hidráulico baixou para 2 e posteriormente para 1 dia, mas, a partir do dia 319 e devido a problemas de instabilidade, decidiu-se repor o tempo de retenção em 2 dias.

De facto, tal como pode ser observado na Figura 3.3, em FAI a eficiência de remoção de CQO solúvel baixou continuamente de 92.5 até 56.5% entre os dias 260 e 319 de operação. Neste período de 59 dias não foram obtidos valores estáveis (com menos de 20% de variação), pelo que os valores representados na Tabela 3.3, representam a média dos valores medidos durante todo o período.

Em FAII foram inicialmente mantidas as mesmas condições operatórias de FAI. Após mudança do tempo de retenção hidráulico de 3 para 2 dias a eficiência de remoção baixou, mas recuperou valores superiores a 90% em cerca de 20 dias.

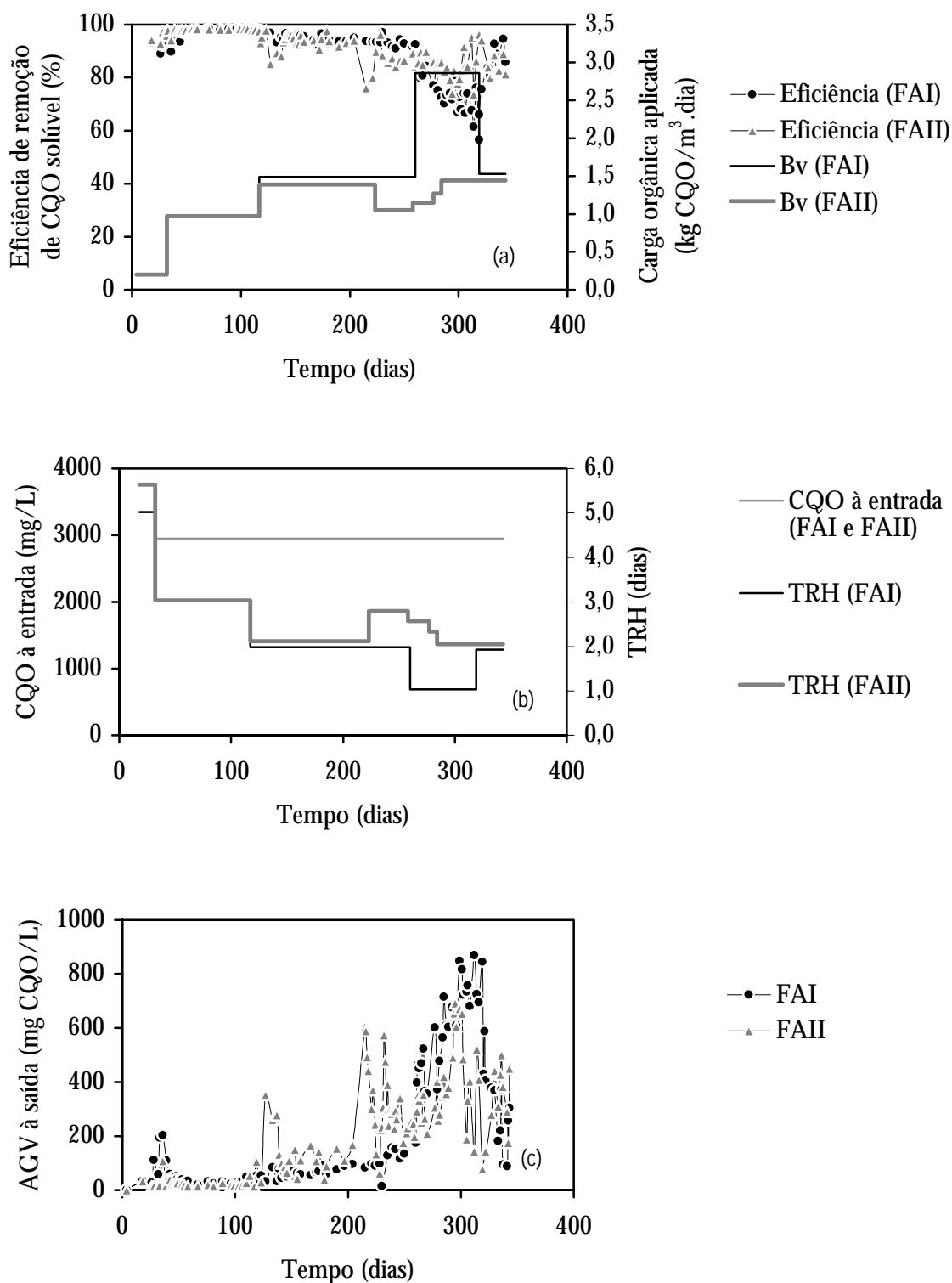


Figura 3.3 Dados operatórios e resultados de exploração do filtro anaeróbio não segmentado (FAI) e segmentado (FAII) durante a operação sem adição de nutrientes. Carga orgânica aplicada e eficiência de remoção (a), Concentração à entrada e tempo de retenção hidráulico (b) e ácidos voláteis à saída (c).

Tabela 3.3 Dados operatórios e resultados de exploração de FAI até ao dia 343 (\pm intervalo com 95% de confiança). Operação sem adição de nutrientes.

Tempo (dias)	TRH (dias)	CQO à entrada (mg/L)	Carga Orgânica Aplicada (kgCQO/m ³ .dia)	CQO solúvel à saída (mg/L)	CQO total à saída (mg/L)	Eficiência de remoção de CQO solúvel (%)	CH ₄ (%)	biogás (m ³ /m ³ .dia)
[32-117]	3.02 (± 0.07)	2948 (± 61)	0.98 (± 0.03)	61 (± 9)	274 (± 53)	97.9 (± 0.3)	65.5 (± 3.3)	0.5 (± 0.1)
[117-260]	1.98 (± 0.04)	↓	1.49 (± 0.04)	168 (± 16)	449 (± 64)	94.1 (± 0.6)	64.0 (± 1.4)	0.8 (± 0.1)
[260-319]	1.03 (± 0.02)		2.86 (± 0.08)	758 (± 80)	1230 (± 117)	74.2 (± 3.1)	-	1.4 (± 0.1)
[319-343]	1.93 (± 0.01)		1.53 (± 0.03)	545 (± 180)	941 (± 219)	81.2 (± 7.1)	-	0.8 (± 0.1)

Tabela 3.4 Dados operatórios e resultados de exploração de FAII até ao dia 343 (\pm intervalo com 95% de confiança). Operação sem adição de nutrientes.

Tempo (dias)	TRH (dias)	CQO à entrada (mg/L)	Carga Orgânica Aplicada (kgCQO/m ³ .dia)	CQO solúvel à saída (mg/L)	CQO total à saída (mg/L)	Eficiência de remoção de CQO solúvel (%)	CH ₄ (média) (%)	biogás (média) (m ³ /m ³ .dia)
[32-117]	3.04 (± 0.05)	2952 (± 60)	0.97 (± 0.03)	58 (± 6)	123 (± 15)	98.0 (± 0.2)	61.6 (± 6.4)	0.5 (± 0.1)
[117-223]	2.12 (± 0.05)	↓	1.39 (± 0.04)	156 (± 25)	301 (± 34)	94.4 (± 1.0)	63.9 (± 11.3)	0.7 (± 0.1)
[223-258]	2.80 (± 0.10)		1.05 (± 0.04)	347 (± 73)	542 (± 68)	88.0 (± 2.4)	-	0.6 (± 0.1)
[258-277]	2.57 (± 0.01)		1.15 (± 0.02)	372 (± 56)	481 (± 71)	87.0 (± 1.6)	-	0.6 (± 0.1)
[277-284]	2.33 (± 0.10)		1.27 (± 0.06)	467 (± 28)	594 (± 56)	85.2 (± 0.7)	-	0.7 (± 0.1)
[284-343]	2.05 (± 0.01)		1.44 (± 0.03)	411 (± 102)	603 (± 129)	86.1 (± 3.7)	-	0.6 (± 0.1)

O digestor manteve-se estável e com elevadas eficiências durante os 70 dias seguintes, mas, após esse período, a eficiência de remoção de CQO baixou acentuadamente, atingindo um mínimo de 76% (Figura 3.3 (a)). Durante esse período de instabilidade, os ácidos voláteis aumentaram significativamente à saída de FAII (Figura 3.3 (c)). Decidiu-se então aumentar o tempo de retenção hidráulico de 2.1 para 2.8 dias, a partir do dia 223 de operação. A eficiência de remoção aumentou e nos três períodos de operação seguintes tentou repor-se o TRH de 2 dias, o que foi conseguido no dia 284 de operação após três diminuições sucessivas entre 2.80 e 2.05 dias (Tabela 3.4 e Figura 3.3 (a)). A partir do dia

319 de operação ambos os digestores operaram com iguais concentrações e TRH.

Em FAII o comportamento de cada andar está representado na Figura 3.4. Na Tabela 3.5, Tabela 3.6 e Tabela 3.7 estão representados os valores médios obtidos, respectivamente, para o 1º, 2º e 3º andares de FAII durante este período operatório. Apesar de o primeiro andar receber a maior carga orgânica, não foi o comportamento deste andar que desestabilizou o digestor. De facto, e tal como pode ser observado na Figura 3.4 (a), a eficiência de remoção no primeiro andar manteve-se quase inalterada com as variações nas condições operatórias impostas, tendo diminuído apenas entre 55 e 49% a partir do dia 117 de operação. Contudo, no segundo andar, a eficiência de remoção baixou acentuadamente entre 56 e 30% durante o mesmo período, tendo atingido valores pontuais de 15%. A carga orgânica à entrada deste andar resultava da eficiência de remoção do 1º andar que foi praticamente constante, mas oscilante, e das variações do TRH, que impuseram um aumento da carga a partir do dia 223. Comparando a Figura 3.4 (a) com a Figura 3.4 (b) e a Tabela 3.5 com a Tabela 3.6, conclui-se que, no 2º andar, a eficiência de remoção era menor do que no 1º andar, mesmo com cargas orgânicas aplicadas significativamente inferiores.

Inicialmente no terceiro andar a eficiência de remoção foi altamente oscilante mas mostrou uma tendência de estabilização com o aumento da carga orgânica aplicada nesse andar, centrando-se em torno de 55%, a partir do dia 117 de operação. A concentração de biomassa era visivelmente baixa nesta fase, devido às baixas concentrações de entrada neste andar, que variaram entre 87 e 1033 mg CQO/L (Tabela 3.7).

Embora nesta fase do trabalho não tenham sido caracterizadas as populações bacterianas presentes em cada andar de FAII, será de esperar que no primeiro andar se encontre uma população mais acidogénica do que nos restantes e que as populações sintrófica e metanogénica ocupem preferencialmente o segundo e terceiro andares. De acordo com os resultados obtidos em cada andar, parece evidente que a população do primeiro andar não foi tão afectada pela ausência de nutrientes como as populações presentes nos restantes andares, especialmente no segundo.

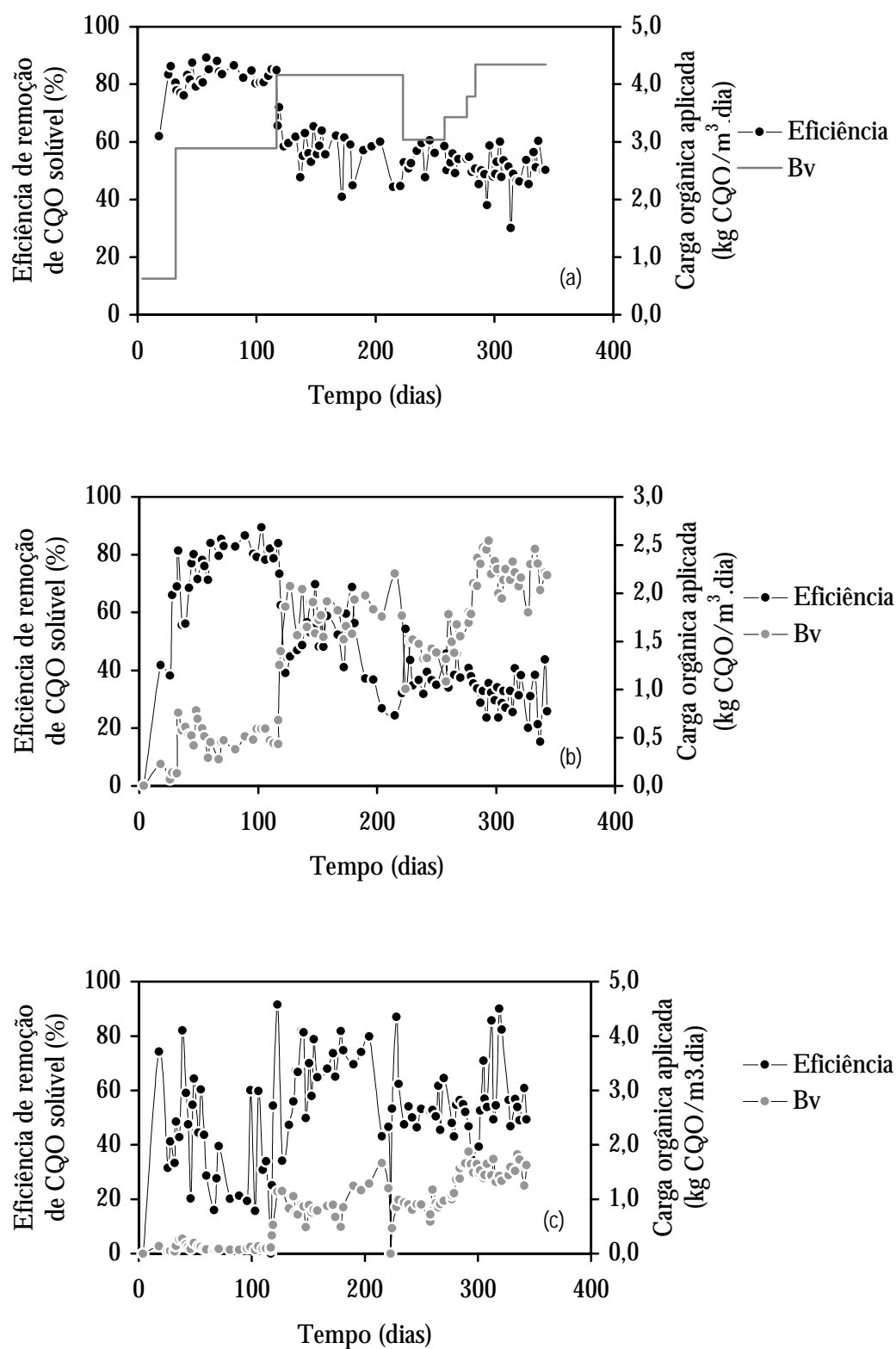


Figura 3.4 Eficiência de remoção e carga orgânica aplicada em cada andar de FAII. 1º andar (a), 2º andar (b) e 3º andar (c). Operação sem adição de nutrientes.

Tabela 3.5 Dados operatórios e resultados de exploração do 1º andar de FAII até ao dia 343 (\pm intervalo com 95% de confiança). Operação sem adição de nutrientes.

Tempo (dias)	TRH (dias)	CQO à entrada (mg/L)	Carga Orgânica Aplicada (kgCQO/m³.dia)	CQO solúvel à saída (mg/L)	Eficiência de remoção de CQO solúvel (%)	CH ₄ (%)	biogás (m³/m³.dia)
[32-117]	1.02 (± 0.02)	2952 (± 60)	2.89 (± 0.08)	495 (± 51)	83.1 (± 1.4)	61.1 (± 2.9)	1.1 (± 0.1)
[117-223]	0.71 (± 0.02)		4.16 (± 0.14)	1272 (± 61)	55.3 (± 3.4)	62.7 (± 4.2)	1.2 (± 0.3)
[223-258]	0.97 (± 0.06)		3.04 (± 0.20)	1278 (± 53)	55.3 (± 2.9)	-	0.9 (± 0.1)
[258-277]	0.86 (± 0.01)		3.43 (± 0.07)	1332 (± 100)	53.5 (± 2.2)	-	0.9 (± 0.1)
[277-284]	0.78 (± 0.03)		3.79 (± 0.16)	1502 (± 47)	52.2 (± 2.1)		1.0 (± 0.1)
[284-343]	0.68 (± 0.01)		4.34 (± 0.09)	1488 (± 62)	49.2 (± 4.0)		0.8 (± 0.1)

Tabela 3.6 Dados operatórios e resultados de exploração do 2º andar de FAII até ao dia 343 (\pm intervalo com 95% de confiança). Operação sem adição de nutrientes.

Tempo (dias)	TRH (dias)	CQO à entrada (mg/L)	Carga Orgânica Aplicada (kgCQO/m³.dia)	CQO solúvel à saída (mg/L)	Eficiência de remoção de CQO solúvel (%)	CH ₄ (%)	biogás (m³/m³.dia)
[32-117]	1.02 (± 0.02)	495 (± 51)	0.49 (± 0.05)	87 (± 15)	82.4 (± 2.3)	63.5 (± 3.3)	0.3 (± 0.1)
[117-223]	0.71 (± 0.02)	1272 (± 61)	1.73 (± 0.10)	545 (± 56)	55.6 (± 4.5)	63.1 (± 2.5)	0.6 (± 0.1)
[223-258]	0.97 (± 0.06)	1278 (± 53)	1.32 (± 0.10)	795 (± 58)	37.9 (± 3.0)	-	0.6 (± 0.1)
[258-277]	0.86 (± 0.01)	1332 (± 100)	1.55 (± 0.12)	801 (± 83)	40.0 (± 3.0)	-	0.6 (± 0.1)
[277-284]	0.78 (± 0.03)	1502 (± 47)	1.93 (± 0.10)	949 (± 67)	36.9 (± 2.6)	-	0.6 (± 0.1)
[284-343]	0.68 (± 0.01)	1488 (± 62)	2.19 (± 0.09)	1033 (± 68)	30.3 (± 4.8)	-	0.6 (± 0.1)

Tabela 3.7 Dados operatórios e resultados de exploração do 3º andar de FAII até ao dia 343. Operação sem adição de nutrientes.

Tempo (dias)	TRH (dias)	CQO à entrada (mg/L)	Carga Orgânica Aplicada (kgCQO/m³.dia)	CQO solúvel à saída (mg/L)	Eficiência de remoção de CQO solúvel (%)	CH ₄ (%)	biogás (m³/m³.dia)
[32-117]	1.02 (± 0.02)	87 (± 15)	0.09 (± 0.02)	58 (± 6)	29.0 (± 12.3)	-	0
[117-223]	0.71 (± 0.02)	545 (± 56)	0.01 (± 0.08)	156 (± 25)	70.6 (± 5.5)	68.6 (± 0.2)	0.4 (± 0.1)
[223-258]	0.97 (± 0.06)	795 (± 58)	0.82 (± 0.08)	347 (± 73)	56.6 (± 8.6)	-	0.2 (± 0.1)
[258-277]	0.86 (± 0.01)	801 (± 83)	0.93 (± 0.10)	372 (± 56)	53.5 (± 4.8)	-	0.2 (± 0.1)
[277-284]	0.78 (± 0.03)	949 (± 67)	1.22 (± 0.10)	467 (± 28)	50.5 (± 5.2)	-	0.5 (± 0.1)
[284-343]	0.68 (± 0.01)	1033 (± 68)	1.52 (± 0.10)	411 (± 102)	61.2 (± 8.4)	-	0.3 (± 0.1)

3.4.2 Comparação das taxas de degradação com e sem nutrientes

Devido aos sucessivos problemas de instabilidade, concluiu-se que a adição de nutrientes era essencial e decidiu-se adicionar macro e micronutrientes de acordo com a composição descrita no **sub-Capítulo 3.3.2**, página **108**. Não foi adicionado azoto já que o substrato utilizado continha uma concentração excessiva deste nutriente.

De facto, a razão CQO/N do substrato situava-se em 20, o que, segundo HENZE E HARREMÕES (1983) é inferior ao mínimo teórico para os sistemas anaeróbios, mesmo com cargas orgânicas mássicas elevadas. A composição da solução de micronutrientes adicionada foi baseada no trabalho de ZEHNDER *et al.* (1980) e contém os elementos essenciais às bactérias metanogénicas que constam na **Tabela 2.3, sub-Capítulo 2.1.3.2**, página **58**.

Quando se adicionaram nutrientes, ambos os digestores estavam a operar em idênticas condições. Em FAI a carga orgânica aplicada era de 1.53 ± 0.03 e em FAII era de 1.44 ± 0.03 kg CQO/m³.dia. Na Figura 3.5 está representada a evolução da eficiência de remoção de CQO solúvel em FAI e FAII, antes e após a adição de nutrientes, mantendo a carga orgânica constante em ambos os digestores em torno de 1.5 kg CQO/m³.dia. Pode observar-se que houve um aumento e uma estabilização da eficiência.

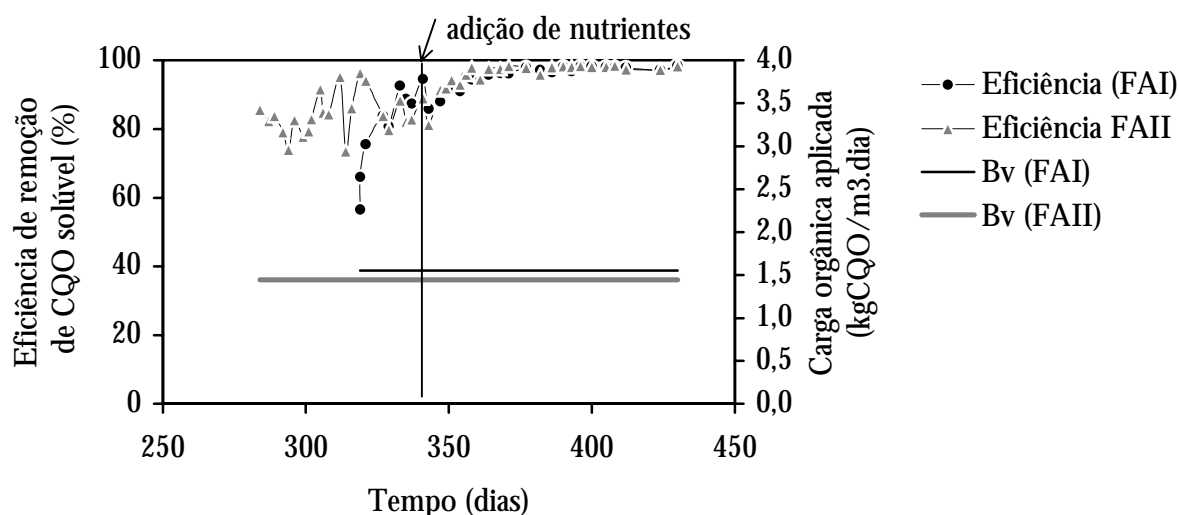


Figura 3.5 Efeito da adição de nutrientes na eficiência de remoção de CQO solúvel em FAI e FAII.

Após a adição de nutrientes, a eficiência de remoção de CQO solúvel aumentou de 81 para 98% em FAI e de 86 para 98% em FAII (Tabela 3.8). Os ácidos voláteis na corrente de saída dos digestores passaram a ter valores residuais muito baixos, cerca de 20 vezes inferiores e as produções de biogás aumentaram.

Tabela 3.8 Comparação do desempenho de FAI e FAII com e sem adição de macro e micronutrientes.

		CQO à entrada (mg/L)	CQO solúvel à saída (mg/L)	CQO total à saída (mg/L)	Eficiência de remoção de CQO solúvel (%)	AGV totais à saída (mg CQO/L)	biogás (m ³ /m ³ .dia)
FAI	sem nutrientes	2948 (±61)	545 (±180)	941 (±219)	81.2 (±7.1)	335.1 (±100.2)	0.81 (±0.1)
	com nutrientes	2948 (±61)	62 (±7)	262 (±91)	97.9 (±0.3)	18.6 (±5.3)	0.86 (±0.1)
FAII	sem nutrientes	2952 (±60)	411 (±102)	603 (±129)	86.1 (±3.7)	320.5 (±69.3)	0.59 (±0.05)
	com nutrientes	2952 (±60)	59 (±8)	178 (±42)	98.0 (±0.4)	15.0 (±1.9)	0.72 (±0.05)

O facto da eficiência de remoção de CQO em FAII na ausência de nutrientes ser superior à verificada em FAI, pode sugerir que este digestor era mais sensível à falta de nutrientes do que o digestor segmentado FAII. No entanto, até ao dia 319 este digestor tinha sido sujeito a uma carga orgânica superior à aplicada em FAII, sendo a eficiência média registada influenciada por esse facto.

Relativamente à variação do funcionamento de cada andar, pode observar-se na Figura 3.6 que, no 1º andar, a eficiência de remoção de CQO solúvel aumentou significativamente, entre 49 e 89% o que fez baixar a carga orgânica aplicada no segundo andar de 2.18 para 0.46 kg CQO/m³.dia e aumentar a eficiência de 30.3 para 75.6% neste andar. No 3º andar, a carga orgânica diminuiu, em média, de 1.52 para 0.11 kg CQO/m³.dia, após a adição de nutrientes. A eficiência deste andar era muito oscilante, tendo-se medido, em alguns dias, valores nulos. O facto da maior parte da remoção de substrato se realizar no primeiro andar é evidenciado pelas produções de biogás. Antes da adição de nutrientes, o 1º andar contribuía com 47.4% do biogás total produzido e o 2º e 3º andares contribuía com 35.0 e 17.6% respectivamente. Após a adição de nutrientes as contribuições passaram a ser 73.2, 19.7 e 7% respectivamente para o 1º, 2º e 3º andares, respectivamente.

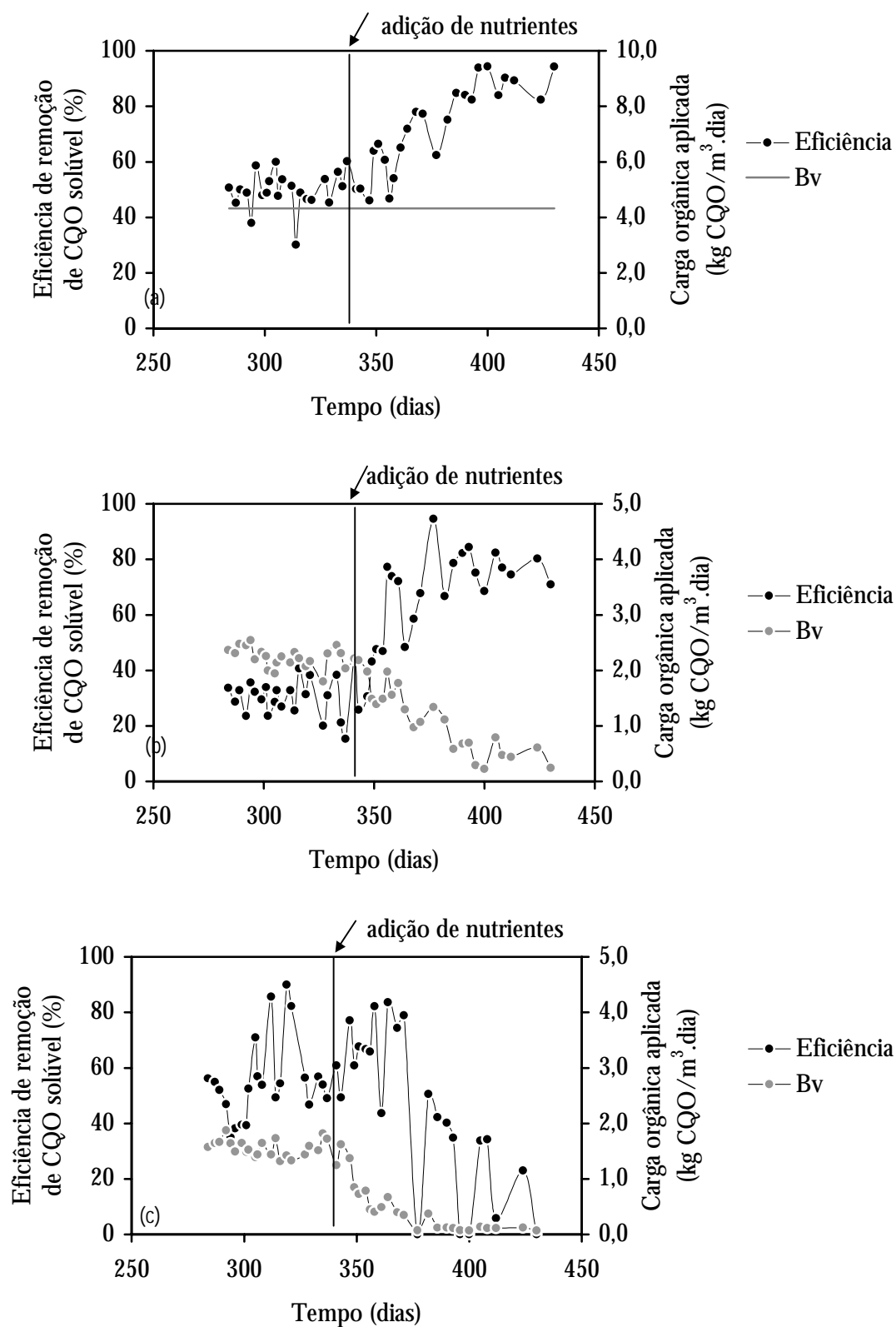


Figura 3.6 Efeito da adição de nutrientes em cada andar de FAII. 1º andar (a), 2º andar (b) e 3º andar (c).

3.4.3 Efeito da concentração de substrato no desempenho, selecção microbiana e características hidrodinâmicas das duas configurações

3.4.3.1 Resultados de exploração e desempenho

Após a constatação de que era essencial adicionar nutrientes para garantir boa estabilidade e eficiência de remoção, comparou-se o funcionamento das duas configurações durante uma operação com tempo de retenção constante e concentração de substrato crescente entre 3 e 12 g CQO/L. Na Figura 3.7 está representada a evolução ao longo do tempo da carga orgânica aplicada (Bv), da eficiência de remoção, do tempo de retenção hidráulico (TRH), da concentração de entrada e dos ácidos voláteis (AGV) na corrente de saída de cada digestor.

Os valores médios de estado (pseudo) estacionário dos parâmetros operatórios estão calculados na Tabela 3.9 e na Tabela 3.10, para FAI e FAII, respectivamente. Durante este período operatório, os digestores operaram de modo estável e com elevadas eficiências, sempre superiores a 97% (em termos de CQO solúvel). Não houve diferenças significativas entre as duas configurações, excepto para a concentração de 12 g CQO/L, em que se observou um aumento significativo dos sólidos na corrente de saída de FAII. Este aumento está evidenciado na Figura 3.8, onde se representam os sólidos voláteis à saída de FAI e de FAII em função da carga orgânica aplicada. Salienta-se que, tal como referido no **sub-Capítulo 3.3.3**, página 109, os sólidos voláteis não foram medidos directamente, mas sim estimados pela diferença entre a CQO total e solúvel. Em FAII, além dos sólidos terem aumentado significativamente, observou-se uma grande oscilação nos valores, traduzida no largo intervalo de confiança associado ao teor de sólidos para a carga de 6 kg CQO/m³.dia.

Os ácidos voláteis à saída estão representados na Tabela 3.11 e na Tabela 3.12 para FAI e FAII, respectivamente. Os valores médios obtidos para lactato, formato e butirato em ambos os digestores foram inferiores ao limite de detecção de cada um destes ácidos, pelo que se consideraram nulos. As diferenças entre FAI e FAII nos teores de acetato e propionato não foram significativas.

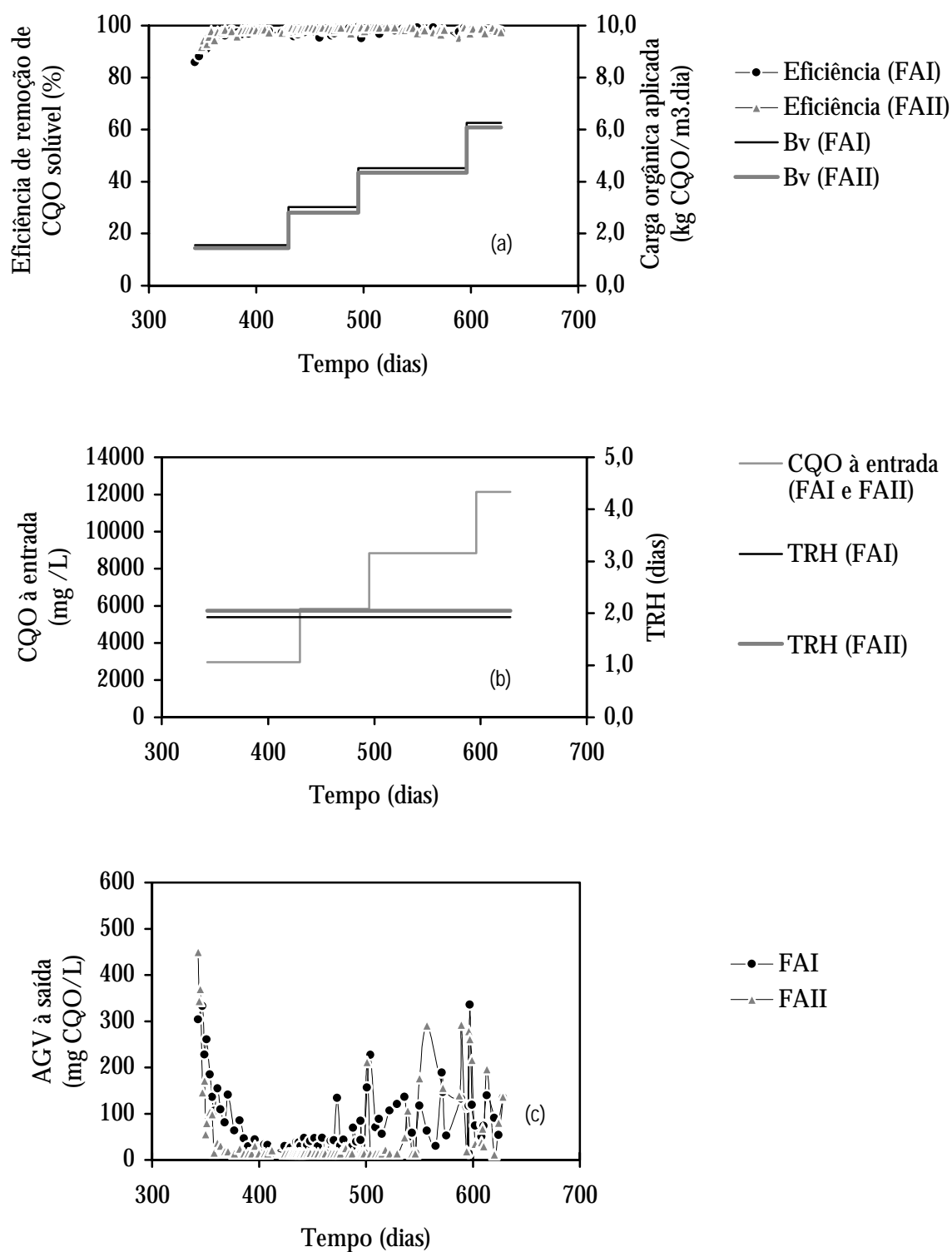


Figura 3.7 Dados operatórios e resultados de exploração do filtro anaeróbio não segmentado (FAI) e segmentado (FAII) durante a operação com tempo de retenção de 2 dias e concentração de substrato crescente entre 3 e 12 g CQO/L. Carga orgânica aplicada e eficiência de remoção (a), Concentração à entrada e tempo de retenção hidráulico (b) e ácidos voláteis à saída (c).

Tabela 3.9 Dados operatórios e resultados de exploração de FAI com tempo de retenção de 2 dias e concentração de substrato crescente entre 3 e 12 g CQO/L (\pm intervalo com 95% de confiança).

Tempo (dias)	TRH (dias)	CQO à entrada (mg/L)	Carga Orgânica Aplicada (kgCQO/m ³ .dia)	CQO solúvel à saída (mg/L)	CQO total à saída (mg/L)	Eficiência de remoção CQO solúvel (%)	CH ₄ (%)	biogás (m ³ /m ³ .dia)
[343-430]	1.93 (± 0.01)	2948 (± 61)	1.53 (± 0.03)	62 (± 7)	320 (± 129)	97.9 (± 0.3)	65.3 (± 1.0)	0.9 (± 0.1)
[430-495]		5831 (± 287)	3.02 (± 0.15)	130 (± 32)	572 (± 173)	97.7 (± 0.6)	64.8 (± 0.6)	1.8 (± 0.1)
[495-596]		8837 (± 411)	4.58 (± 0.21)	157 (± 34)	973 (± 217)	98.2 (± 0.4)	62.3 (± 1.3)	2.6 (± 0.1)
[596-628]		12143 (± 403)	6.29 (± 0.21)	215 (± 26)	2369 (± 254)	98.2 (± 0.3)	61.0 (± 0.4)	3.5 (± 0.1)

Tabela 3.10 Dados operatórios e resultados de exploração de FAII com tempo de retenção de 2 dias e concentração de substrato crescente entre 3 e 12 g CQO/L (\pm intervalo com 95% de confiança).

Tempo (dias)	TRH (dias)	CQO à entrada (mg/L)	Carga Orgânica Aplicada (kgCQO/m ³ .dia)	CQO solúvel à saída (mg/L)	CQO total à saída (mg/L)	Eficiência de remoção CQO solúvel (%)	CH ₄ Média (%)	biogás (m ³ /m ³ .dia)
[343-430]	2.05 (± 0.01)	2952 (± 60)	1.44 (± 0.03)	59 (± 8)	178 (± 42)	98.0 (± 0.4)	67.0 (± 6.9)	0.7 (± 0.1)
[430-495]		5831 (± 287)	2.84 (± 0.14)	68 (± 16)	204 (± 47)	98.8 (± 0.3)	64.4 (± 5.0)	1.5 (± 0.1)
[495-596]		8837 (± 411)	4.31 (± 0.20)	175 (± 56)	1410 (± 407)	97.9 (± 0.7)	61.0 (± 3.2)	2.3 (± 0.1)
[596-628]		12143 (± 403)	5.92 (± 0.20)	200 (± 55)	4506 (± 1677)	98.3 (± 0.5)	58.4 (± 1.3)	3.3 (± 0.1)

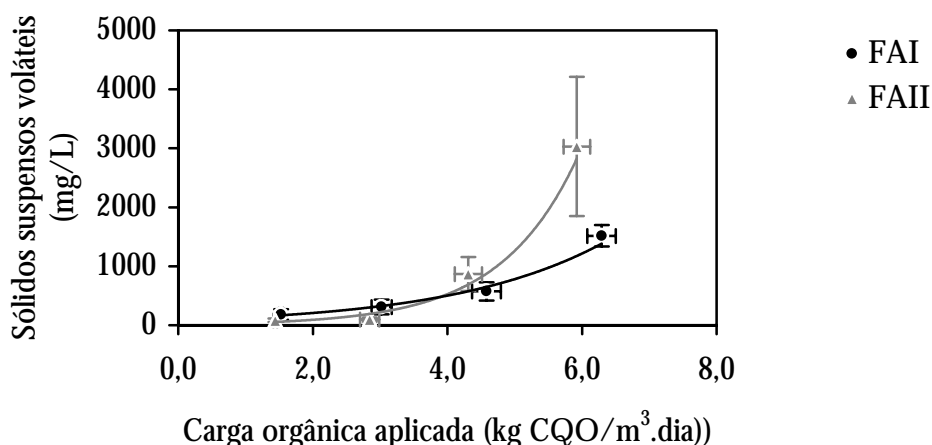


Figura 3.8 Comparação dos teores de sólidos voláteis à saída de FAI e de FAII durante a operação com tempo de retenção de 2 dias e concentração de substrato crescente entre 3 e 12 g CQO/L.

Tabela 3.11 Valores médios dos teores de AGV obtidos à saída de FAI durante o período de operação com tempo de retenção de 2 dias e concentração de substrato crescente entre 3 e 12 g CQO/L.

Tempo (dias)	lactato (mg/L)	formato (mg/L)	acetato (mg/L)	propionato (mg/L)	butirato (mg/L)	AGV totais (mg CQO/L)
[343-430]	0	0	5.9±4.6	0	0	6.3±4.6
[430-495]	0	0	25.2±13.0	6.31±2.91	0	36.5±19.9
[495-596]	0	0	54.3±22.4	14.6±7.5	0	79.6±34.7
[596-628]	0	0	61.5±23.6	10.3±6.9	0	81.2±36.4

Tabela 3.12 Valores médios dos teores de AGV obtidos à saída de FAII durante o período de operação com tempo de retenção de 2 dias e concentração de substrato crescente entre 3 e 12 g CQO/L.

Tempo (dias)	lactato (mg/L)	formato (mg/L)	acetato (mg/L)	propionato (mg/L)	butirato (mg/L)	AGV totais (mg CQO/L)
[343-430]	0	0	0	0	0	0
[430-495]	0	0	0	0	0	0
[495-596]	0	0	81.5±45.5	23.2±12.5	0	121.4±70.0
[596-628]	0	0	62.5±29.1	10.6±10.5	0	82.7±45.3

O rendimento médio em metano obtido em FAI (370 ± 32 LCH₄/kgCQO_{removido}) foi ligeiramente superior ao observado em FAII neste período operatório (335 ± 30 LCH₄/kgCQO_{removido}). Contudo as diferenças não são significativas, dado que os intervalos associados aos valores (95% de confiança), se sobrepõem (Figura 3.9). Observou-se em ambos os digestores uma tendência linearmente decrescente do rendimento com a carga orgânica aplicada.

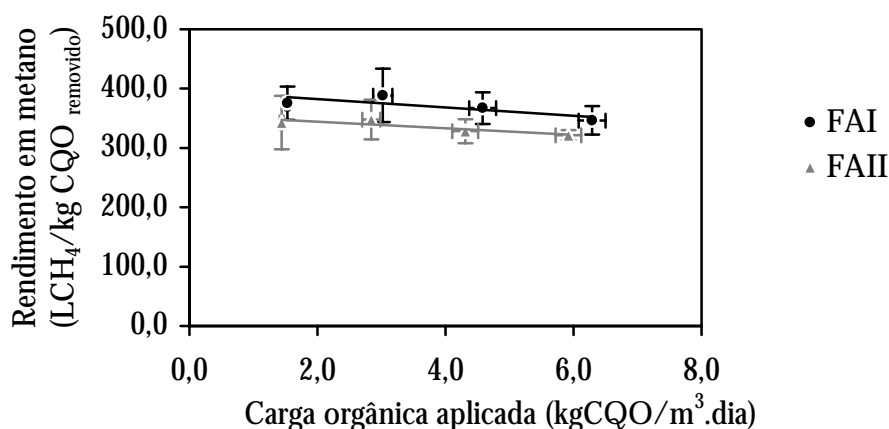


Figura 3.9 Comparação dos rendimentos em metano obtidos em FAI e FAII durante a operação com tempo de retenção constante.

3.4.3.2 Comportamento de cada andar de FAII

No decorrer deste período operatório a contribuição de cada andar para a eficiência global do digestor segmentado foi sofrendo alterações. Na Figura 3.10, Figura 3.11 e Figura 3.12 estão representados os valores evolutivos ao longo do tempo da eficiência de remoção, da carga orgânica aplicada, do tempo de retenção hidráulico, da concentração à entrada e dos teores de AGV na corrente de saída do 1º, 2º e 3º andares de FAII, respectivamente. Na Tabela 3.13, Tabela 3.14 e Tabela 3.15 estão registados os valores médios destes parâmetros para cada andar. Embora não se possam considerar estes valores como representativos de estados estacionários, devido à variabilidades das condições de saída e de entrada, dão uma ideia da tendência de variação destes parâmetros com o aumento da concentração de substrato e consequentemente da carga orgânica. Durante este período experimental o tempo de retenção hidráulico de cada andar manteve-se constante em 0.68 dias. No primeiro andar, a carga orgânica aplicada atingiu 18 kg CQO/m³.dia, mas a eficiência deste andar diminuiu progressivamente entre 89 e 47% (Figura 3.10 (a) e Tabela 3.13). Os teores de AGV aumentaram consideravelmente desde cerca de 200 mg CQO/L até 3000 mg CQO/L (Figura 3.10 (c)). A diminuição da eficiência do 1º andar provocou um aumento da carga orgânica entre 0.5 e 9.3 kg CQO/m³.dia à entrada do 2º andar. Contudo, este aumento não afectou a eficiência de remoção de CQO neste andar, que se manteve praticamente constante em torno de 80% (Figura 3.11 (a) e Tabela 3.14). No entanto, a concentração de CQO solúvel à saída deste andar aumentou entre 73 e 1100 mg CQO/L, pelo que a carga orgânica à entrada do terceiro andar aumentou entre 0.1 e 1.7 kg CQO/m³.dia. Neste andar a eficiência de remoção foi muito oscilante, apresentando uma tendência crescente com o aumento da carga orgânica (Figura 3.12 (a) e Tabela 3.15). Para as mais baixas cargas orgânicas aplicadas registaram-se alguns valores nulos.

A contribuição de cada andar para a produção total de biogás em FAII está representada na Figura 3.13, em função da carga orgânica aplicada. A contribuição inicial do primeiro andar foi de 73%, seguindo-se o segundo andar com 20% e o 3º andar com apenas 7% do biogás total produzido.

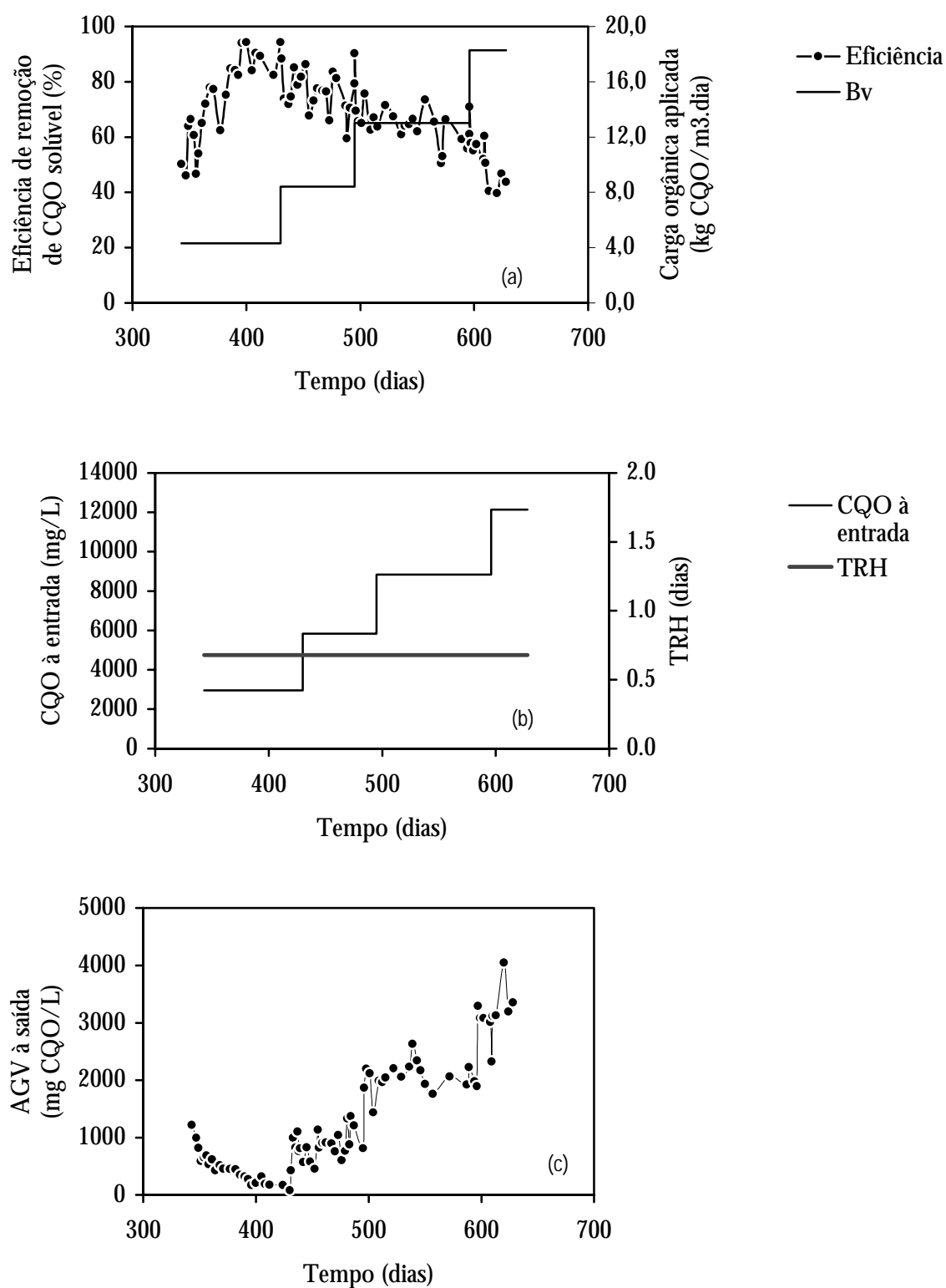


Figura 3.10 Dados operatórios e resultados de exploração do 1º andar do filtro anaeróbio segmentado (FAII) durante a operação com tempo de retenção constante em 2 dias e concentração de substrato crescente entre 3 e 12 g CQO/L. Carga orgânica aplicada e eficiência de remoção (a), Concentração à entrada e tempo de retenção hidráulico (b) e ácidos voláteis à saída (c).

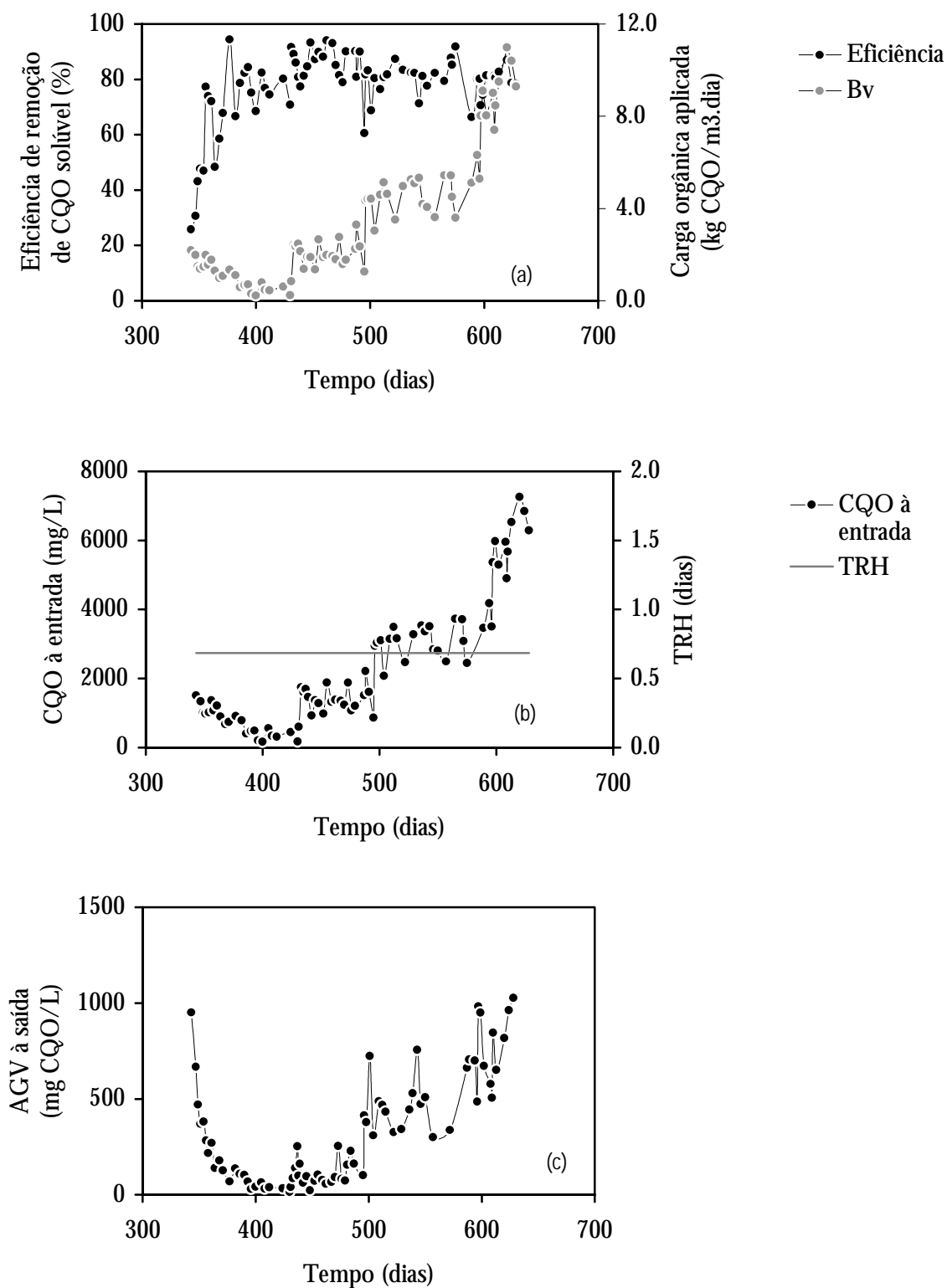


Figura 3.11 Dados operatórios e resultados de exploração do 2º andar do filtro anaeróbio segmentado (FAII) durante a operação com tempo de retenção constante em 2 dias e concentração de substrato crescente entre 3 e 12 g CQO/L. Carga orgânica aplicada e eficiência de remoção (a), Concentração à entrada e tempo de retenção hidráulico (b) e ácidos voláteis à saída (c).

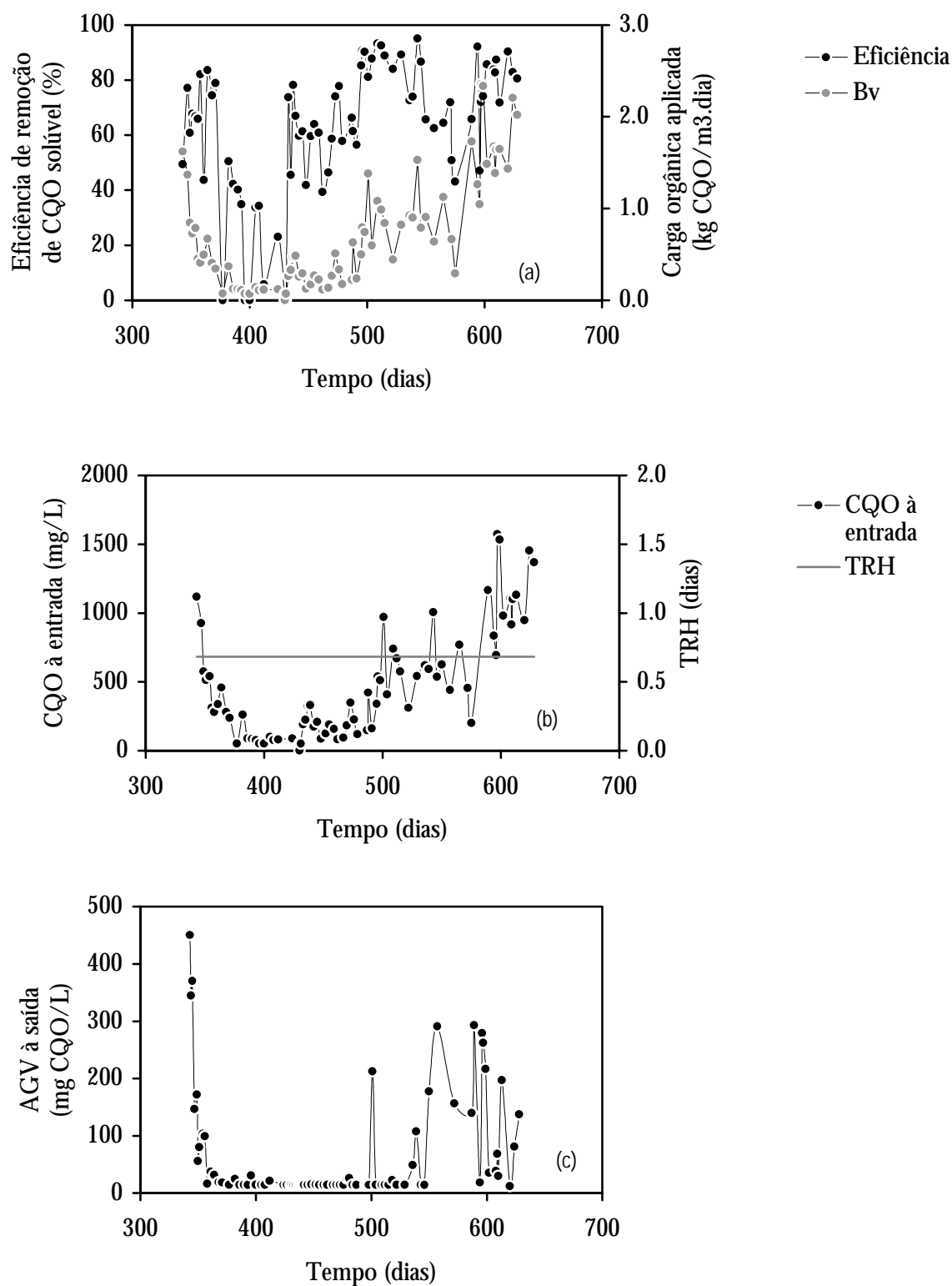


Figura 3.12 Dados operatórios e resultados de exploração do 3º andar do filtro anaeróbio segmentado (FAII) durante a operação com tempo de retenção constante em 2 dias e concentração de substrato crescente entre 3 e 12 g CQO/L. Carga orgânica aplicada e eficiência de remoção (a), Concentração à entrada e tempo de retenção hidráulico (b) e ácidos voláteis à saída (c).

Tabela 3.13 Dados operatórios e resultados de exploração do 1º andar de FAII durante a operação com tempo de retenção constante em 2 dias e concentração de substrato crescente (\pm intervalo com 95% de confiança).

Tempo dias)	TRH dias)	CQO à entrada (mg/L)	Carga Orgânica Aplicada (kgCQO/m³.dia)	CQO solúvel à saída (mg/L)	Eficiência de remoção de CQO solúvel (%)	CH ₄ (%)	biogás (m³/m³.dia)
[343-430]	0.68 (± 0.01)	2952 (± 60)	4.34 (± 0.09)	327 (± 113)	89.1 (± 3.7)	66.2 (± 0.1)	1.6 (± 0.2)
[430-495]		5831 (± 287)	8.58 (± 0.42)	1420 (± 204)	74.5 (± 3.9)	61.9 (± 0.8)	3.1 (± 0.2)
[495-596]		8837 (± 411)	13.0 (± 0.6)	3276 (± 248)	62.1 (± 3.1)	55.2 (± 1.4)	3.7 (± 0.2)
[596-628]		12143 (± 403)	17.9 (± 0.6)	6202 (± 537)	47.7 (± 5.0)	47.7 (± 1.0)	4.7 (± 0.1)

Tabela 3.14 Dados operatórios e resultados de exploração do 2º andar de FAII durante a operação com tempo de retenção constante em 2 dias e concentração de substrato crescente (\pm intervalo com 95% de confiança).

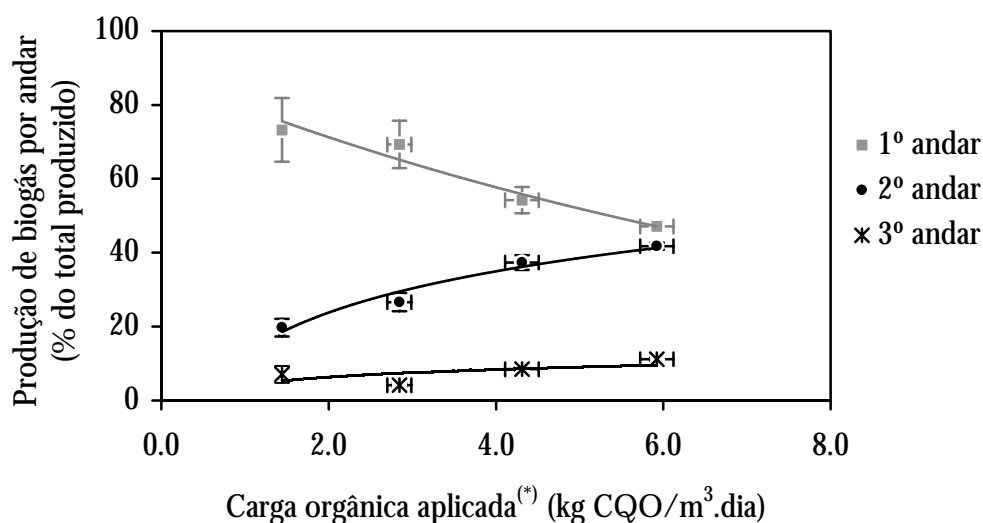
Tempo dias)	TRH dias)	CQO à entrada (mg/L)	Carga Orgânica Aplicada (kgCQO/m³.dia)	CQO solúvel à saída (mg/L)	Eficiência de remoção de CQO solúvel (%)	CH ₄ (%)	biogás (m³/m³.dia)
[343-430]	0.68 (± 0.01)	327 (± 113)	0.48 (± 0.17)	73 (± 14)	75.6 (± 3.9)	69.2 (± 0.2)	0.4 (± 0.1)
[430-495]		1420 (± 204)	2.09 (± 0.30)	199 (± 55)	85.4 (± 4.6)	70.4 (± 0.8)	1.2 (± 0.1)
[495-596]		3276 (± 248)	4.82 (± 0.37)	638 (± 125)	80.8 (± 3.2)	67.6 (± 2.6)	2.6 (± 0.1)
[596-628]		6202 (± 537)	9.12 (± 0.79)	1144 (± 137)	81.4 (± 2.0)	67.0 (± 0.9)	4.1 (± 0.1)

Tabela 3.15 Dados operatórios e resultados de exploração do 3º andar de FAII durante a operação com tempo de retenção constante em 2 dias e concentração de substrato crescente (\pm intervalo com 95% de confiança).

Tempo dias)	TRH dias)	CQO à entrada (mg/L)	Carga Orgânica Aplicada (kgCQO/m³.dia)	CQO solúvel à saída (mg/L)	Eficiência de remoção de CQO solúvel (%)	CH ₄ (%)	biogás (m³/m³.dia)
[343-430]	0.68 (± 0.01)	73 (± 14)	0.11 (± 0.02)	59 (± 8)	16.1 (± 11.8)	69.2 (± 0.2)	0.2 (± 0.1)
[430-495]		199 (± 55)	0.29 (± 0.08)	68 (± 16)	62.1 (± 6.4)	68.5 (± 0.9)	0.2 (± 0.1)
[495-596]		638 (± 125)	0.94 (± 0.18)	175 (± 56)	70.1 (± 8.1)	69.0 (± 1.5)	0.6 (± 0.1)
[596-628]		1144 (± 137)	1.68 (± 0.20)	200 (± 55)	82.8 (± 4.0)	71.4 (± 0.7)	1.1 (± 0.1)

Com o aumento da carga orgânica até 6 kg CQO/m³.dia, a contribuição do primeiro andar diminuiu até 47% e o 2º andar ganhou importância, tendo praticamente igualado a contribuição do 1º andar em termos de produção de biogás. No 3º andar a contribuição

para a produção de biogás, apesar de ter aumentado com o aumento da carga orgânica, não passou dos 11% durante este período operatório.



(*) no reactor global

Figura 3.13 Contribuição de cada andar para a produção total de biogás em FAII durante a operação com tempo de retenção constante.

Os rendimentos em metano foram calculados para cada andar de FAII, tendo-se obtido para o 1º andar um valor médio de 273.6 ± 37.3 LCH₄/kgCQO_{removido}. No 2º e 3º andares obtiveram-se valores de 428.8 ± 53.9 e de 619.8 ± 58.9 LCH₄/kgCQO_{removido}, respectivamente, que são superiores aos máximos teóricos possíveis em condições mesófilas (397 L CH₄/kg CQO removido). Embora no 2º andar o valor mínimo do intervalo de confiança esteja dentro da gama de valores possíveis, no 3º andar o valor obtido é excessivo, sendo atribuído a erros experimentais resultantes do funcionamento do contador de gás. De qualquer modo a tendência crescente dos rendimentos em metano, do 1º para o 3º andar era esperada, indicando que a metanogénese se realiza preferencialmente no 3º andar.

3.4.3.3 Perfis de substrato e ácidos voláteis

Após o estabelecimento de condições estacionárias nos digestores, foram determinados perfis de CQO solúvel e de AGV ao longo da altura de cada digestor. Na Figura 3.14 à Figura 3.17 estão representados estes perfis para as concentrações de substrato de 3, 6, 9 e 12 gCQO/L, respectivamente.

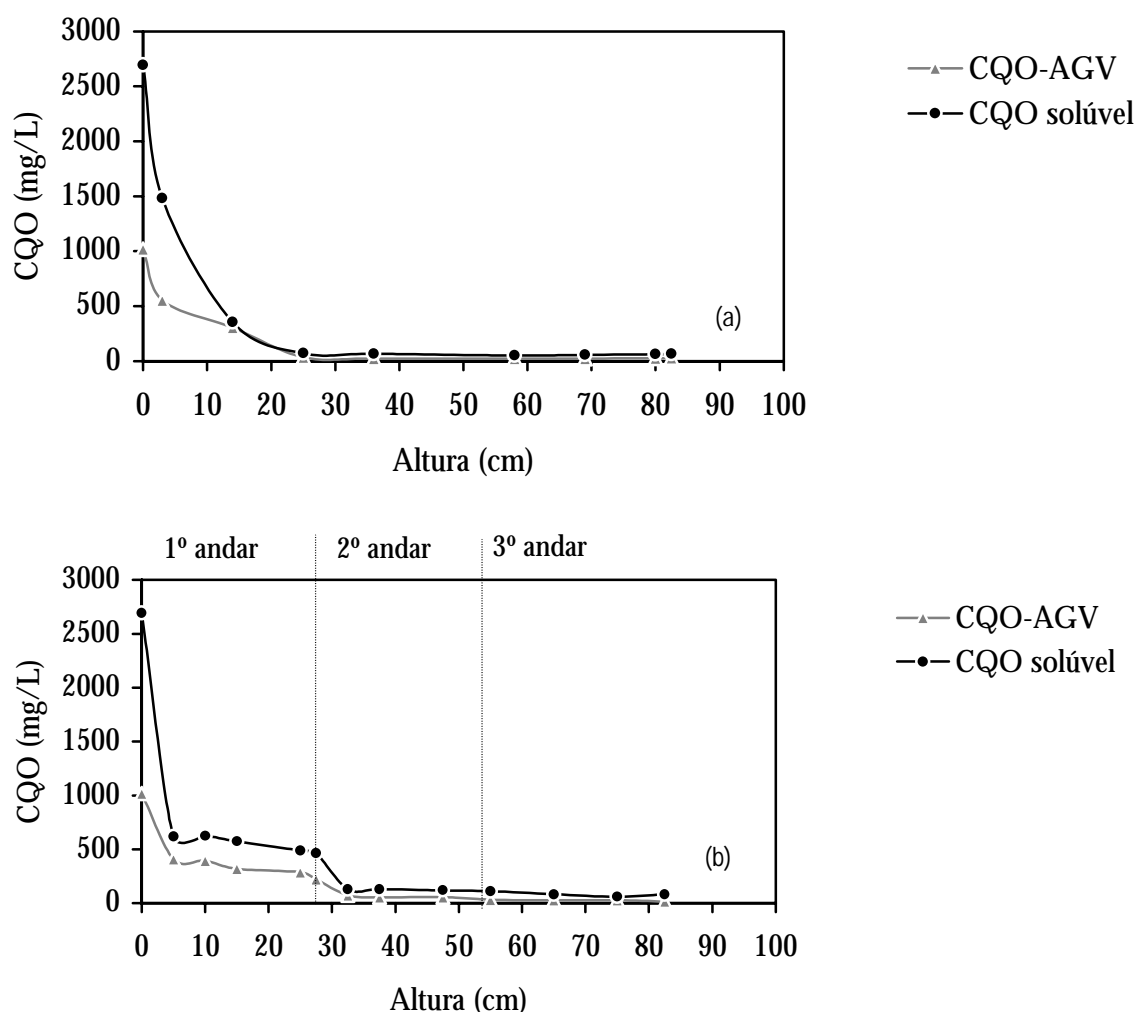


Figura 3.14 Perfis de CQO solúvel e de CQO dos AGV em FAI (a) e FAII (b) durante a operação com TRH igual a 2 dias e concentração média à entrada de 3000 mg CQO/L.

Da análise da Figura 3.14, pode observar-se que a fracção de substrato não acidificado “desaparece” a partir de 15 cm da altura em FAI, e que os AGV desaparecem virtualmente a partir de 30 cm de altura. Este facto pode ser explicado pela baixa carga orgânica aplicada e/ou pela mistura induzida pela produção de biogás. O perfil obtido em FAII, onde o efeito de mistura é inferior, permite concluir que há uma elevada conversão no 1º andar, uma pequena conversão no 2º andar, e que no 3º andar não ocorre remoção de CQO. Assim, será de esperar que o perfil de CQO mais abrupto observado em FAI seja devido em parte a efeitos de mistura e em parte a uma inactivação da zona superior do digestor, à semelhança do que acontece com o 3º andar do digestor segmentado. No entanto, como

será discutido a seguir (**sub-Capítulo 3.4.3.4**, página 152), mesmo no topo dos digestores e nestas condições operatórias, a actividades metanogénicas medidas eram elevadas, o que indica que as populações metanogénica e sintrófica resistem e mantêm a actividade quando em contacto com concentrações residuais de substrato. Para estas condições experimentais não foi detectado aumento da concentração de AGV em nenhuma secção dos digestores, indicando que a fase acidogénica ou ocorreu antes da entrada nos digestores ou foi compensada pelo consumo de AGV pelas bactérias acetogénicas e metanogénicas.

Para a concentração de entrada de 6000 mg CQO/L, foi observado o mesmo tipo de comportamento (Figura 3.15).

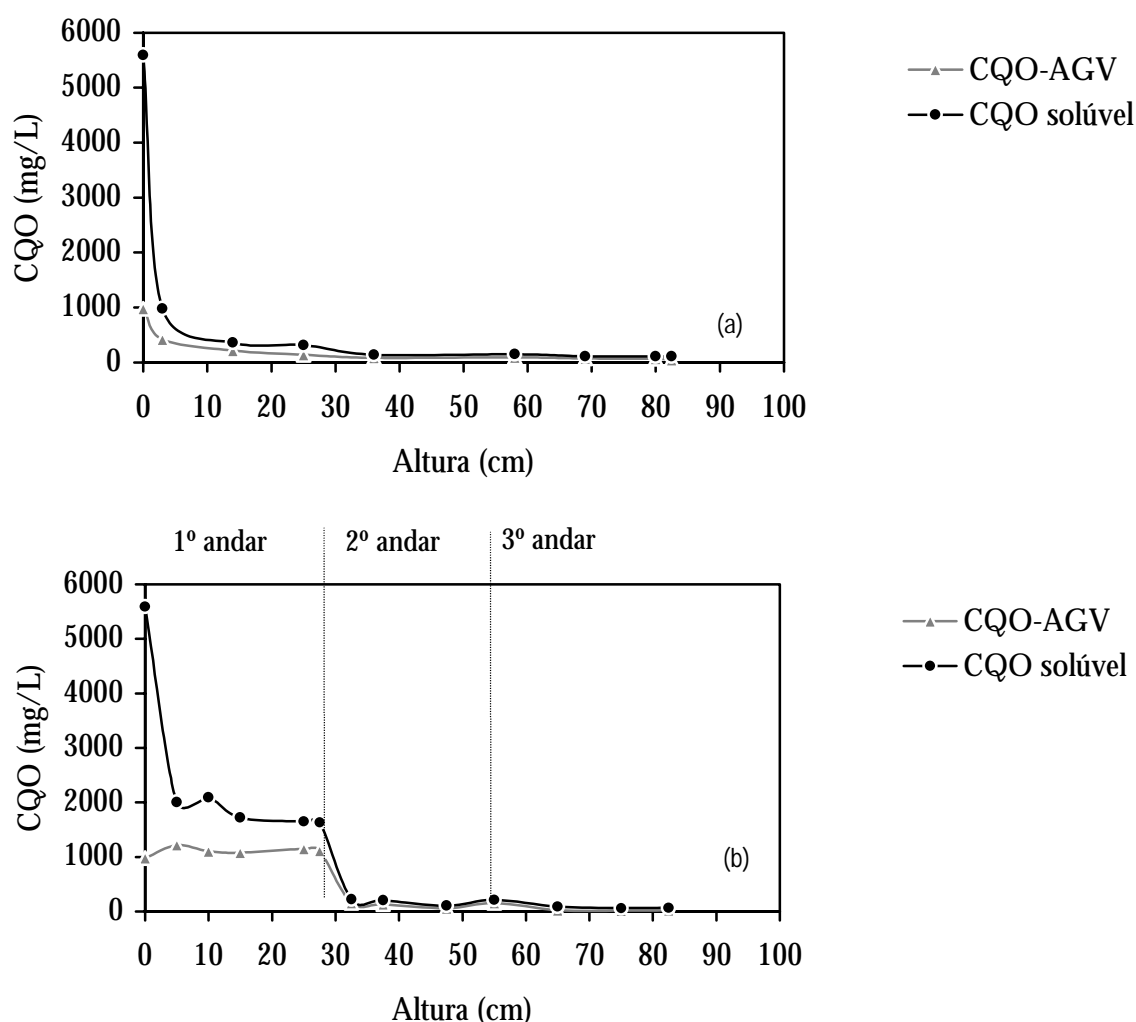


Figura 3.15 Perfis de CQO solúvel e de CQO dos AGV em FAI (a) e FAII (b) durante a operação com TRH igual a 2 dias e concentração média à entrada de 6000 mg CQO/L.

Verificou-se um aumento da fracção de substrato não acidificado no 1º andar de FAII, mantendo-se essa fracção constante ao longo da altura, provavelmente devido a efeitos de mistura. A fracção de substrato não acidificado na base de FAI era menor. Também nestas condições, a partir do segundo andar praticamente não ocorreu mais degradação.

Para a concentração média de entrada de 9000 mg/L (Figura 3.16), os perfis de degradação são mais uma vez do tipo dos anteriores, não se notando uma formação de AGV em termos globais.

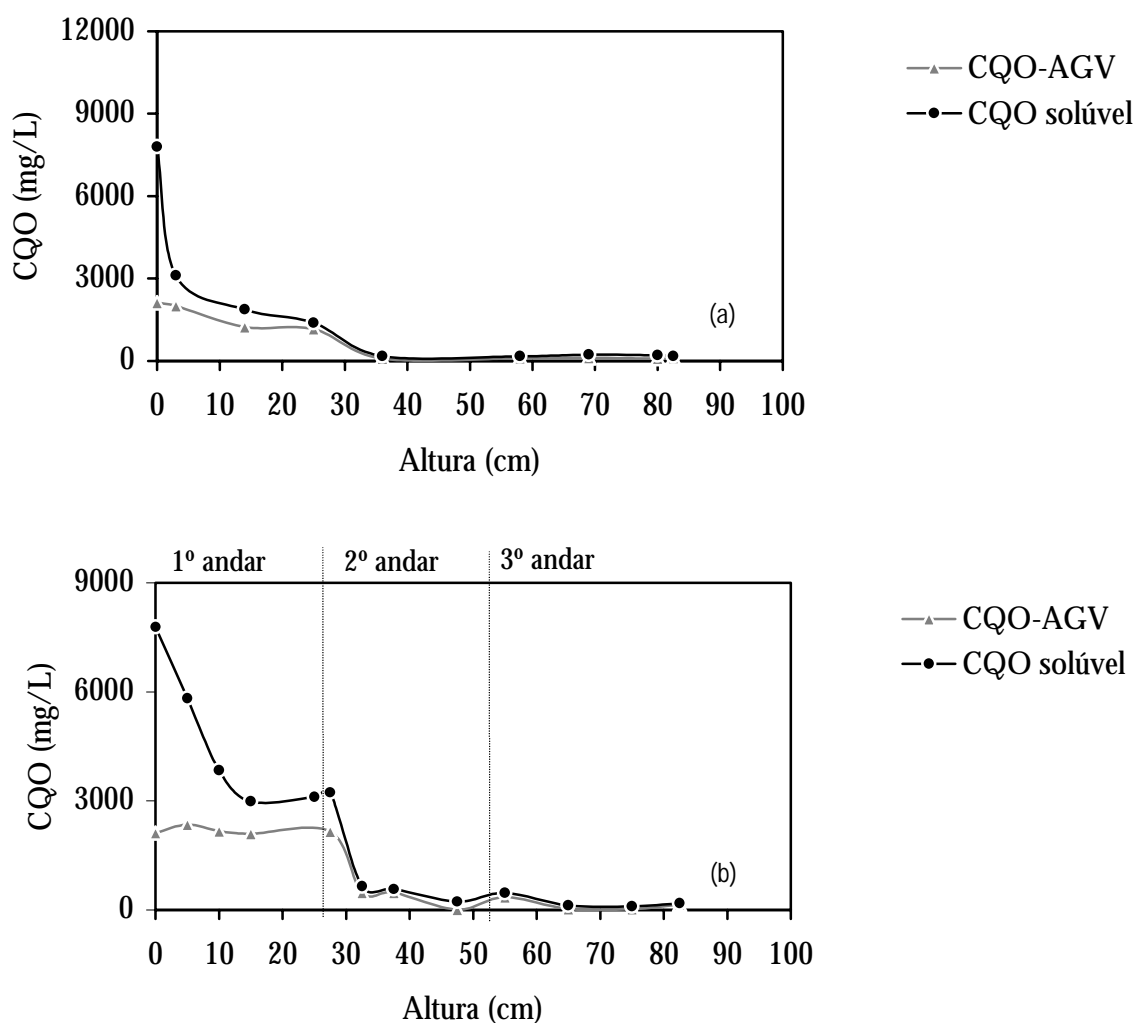


Figura 3.16 Perfis de CQO solúvel e de CQO dos AGV em FAI (a) e FAII (b) durante a operação com TRH igual a 2 dias e concentração média à entrada de 9000 mg CQO/L.

Para a concentração média de entrada de 12000 mg CQO/L (Figura 3.17), detectou-se substrato não acidificado até cerca de 60% da altura de FAI, tendo aumentado

consideravelmente no 1º andar de FAII. A seguir à entrada do 3º andar observou-se um decréscimo da concentração de substrato, sugerindo um aumento da contribuição deste andar para a eficiência do processo, nestas condições operatórias.

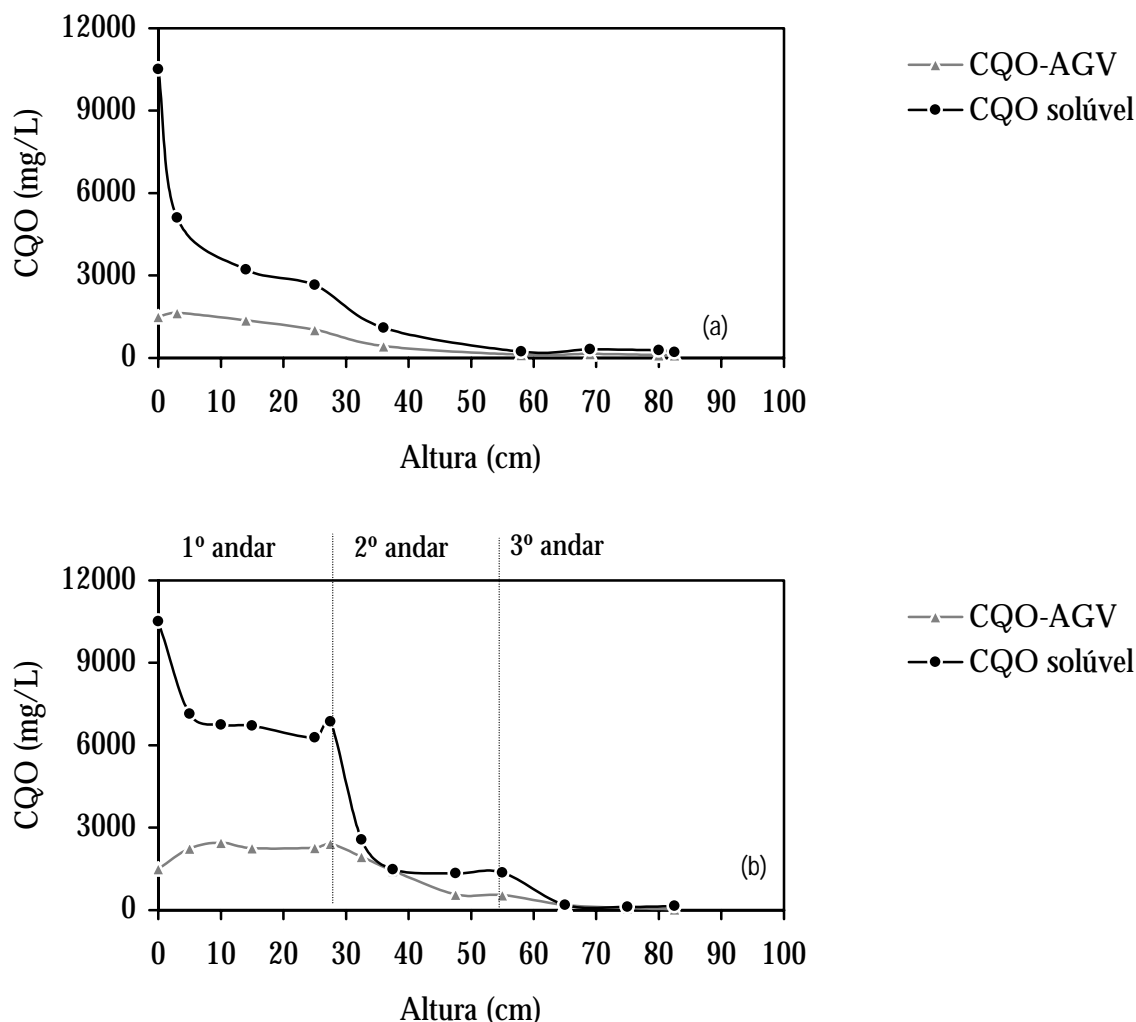


Figura 3.17 Perfis de CQO solúvel e de CQO dos AGV em FAI (a) e FAII (b) durante a operação com TRH igual a 2 dias e concentração média à entrada de 12000 mg CQO/L.

De um modo geral os perfis de CQO apresentados são os esperados. Existem na literatura referências ao mesmo tipo de comportamento em filtros anaeróbios (WEILAND, 1987, DAHAB E YOUNG, 1982), embora a degradação aparente ao longo da altura possa ser mais ou menos rápida dependendo do tipo de substrato e da carga orgânica e/ou hidráulica

aplicadas.

WEILAND (1987) refere a existência duma “zona activa” onde ocorre a degradação, zona essa que se expande com o aumento da carga orgânica aplicada no digestor. Ainda segundo este autor o digestor de leito fixo só perde eficiência quando a tal “zona activa” atinge o topo. Contudo esta opinião é discutível. A actividade específica dos vários grupos tróficos estende-se a todas as zonas dos digestores, mesmo para baixas cargas orgânicas aplicadas, embora de facto exista mais biomassa na base dos digestores e portanto mais actividade em termos globais (ver **sub-Capítulo 3.4.3.4**, página 152). Para elevadas produções de biogás (elevadas cargas aplicadas) o carácter de mistura predomina, justificando, em parte, a forma dos perfis de substrato acima apresentados (ver **sub-Capítulo 3.4.3.6**, página 168).

O teor global de AGV fornece uma ideia geral sobre a fase acidogénica, mas não esclarece sobre a formação-degradação dos ácidos individuais. Pode suceder que o teor global de AGV em determinadas condições permaneça constante, havendo, no entanto formação de alguns ácidos e degradação de outros.

Os perfis de AGV ao longo da altura em ambos os digestores estão representados na Figura 3.18, Figura 3.19, Figura 3.20 e Figura 3.21. Para a concentração média de entrada de 3000 mg CQO/L verificou-se um decréscimo de todos os ácidos voláteis analisados imediatamente a seguir à entrada dos digestores, com excepção do propionato (Figura 3.18).

O lactato diminuiu acentuadamente e o formato, embora em níveis muito baixos, também diminuiu acentuadamente à entrada dos digestores. GORBICKI E STUCKEY (1989) consideraram o formato um intermediário importante em digestores segmentados. Segundo estes autores, após um choque de carga hidráulica, o formato tem tendência a aumentar nos primeiros compartimentos de um digestor segmentado. No presente trabalho o formato foi medido, mas não surgiu em concentrações elevadas, provavelmente devido à ausência de choques hidráulicos, às cargas relativamente inferiores e ao menor número de andares (3 em vez de 8) do que o digestor segmentado dos autores atrás referidos.

Os níveis de butirato foram sempre muito baixos nestas condições operatórias.

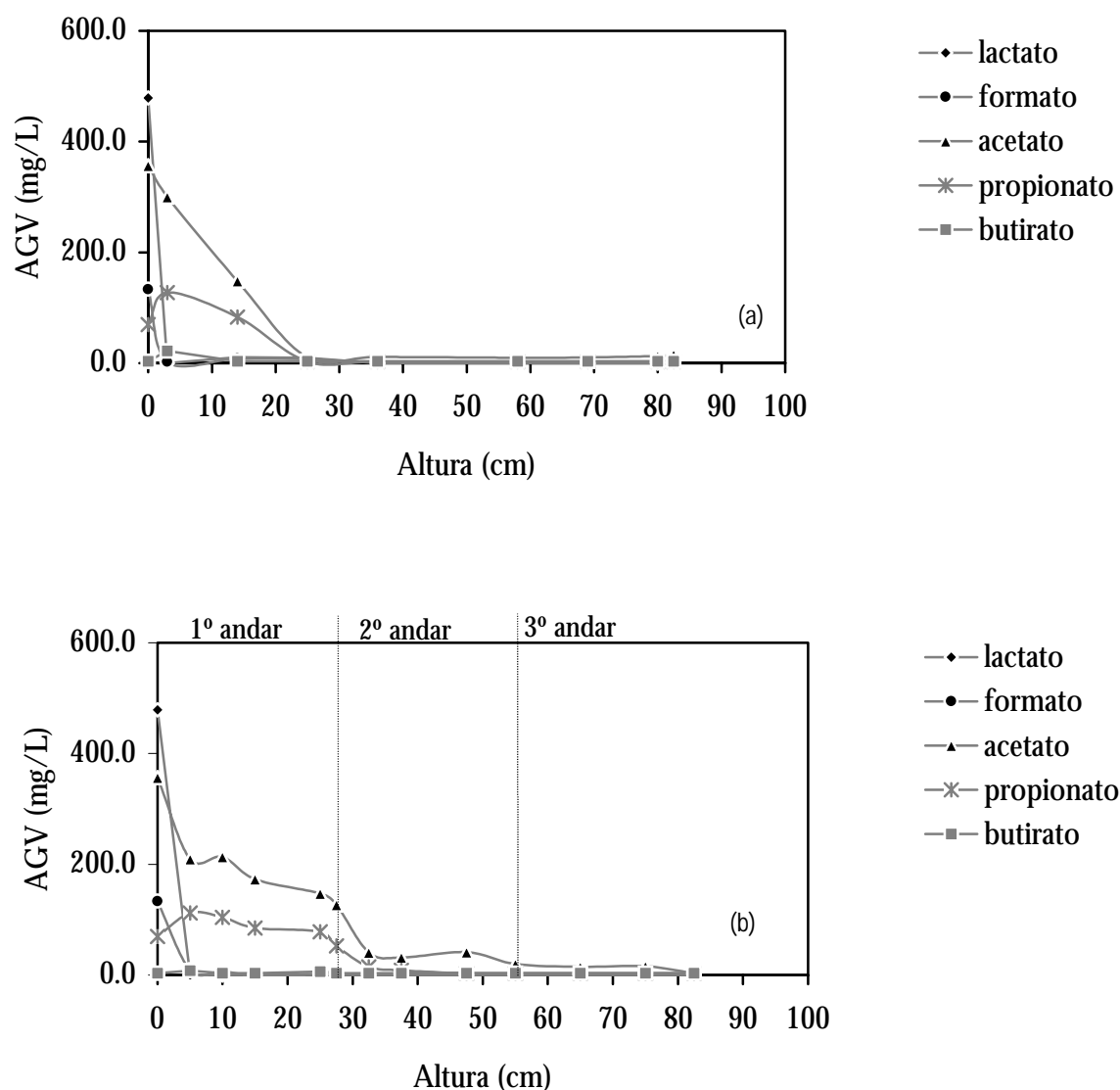


Figura 3.18 Perfis de AGV em FAI (a) e FAII(b) durante a operação com TRH igual a 2 dias e concentração média à entrada de 3000 mg CQO/L.

Para a concentração média de entrada de 6000 mg CQO/L (Figura 3.19), verificou-se em FAI uma degradação rápida de lactato e formato imediatamente a seguir à entrada, e o acetato e propionato degradaram-se mais lentamente. Contudo, a partir de 35 cm de altura do digestor, não se detectaram variações apreciáveis de AGV ao longo da altura.

Em FAII e apesar da Figura 3.15 (b) ter indicado não haver variações nos teores dos AGV em termos globais, verificou-se uma degradação rápida de lactato e formato à entrada do 1º andar e uma produção acentuada de acetato e propionato, atingindo estes ácidos

valores de 625 e 221 mg/L respectivamente, à saída do primeiro andar. No segundo andar deu-se uma elevada conversão destes ácidos, sugerindo que a actividade metanogénica e sintrófica neste andar deve ser elevada.

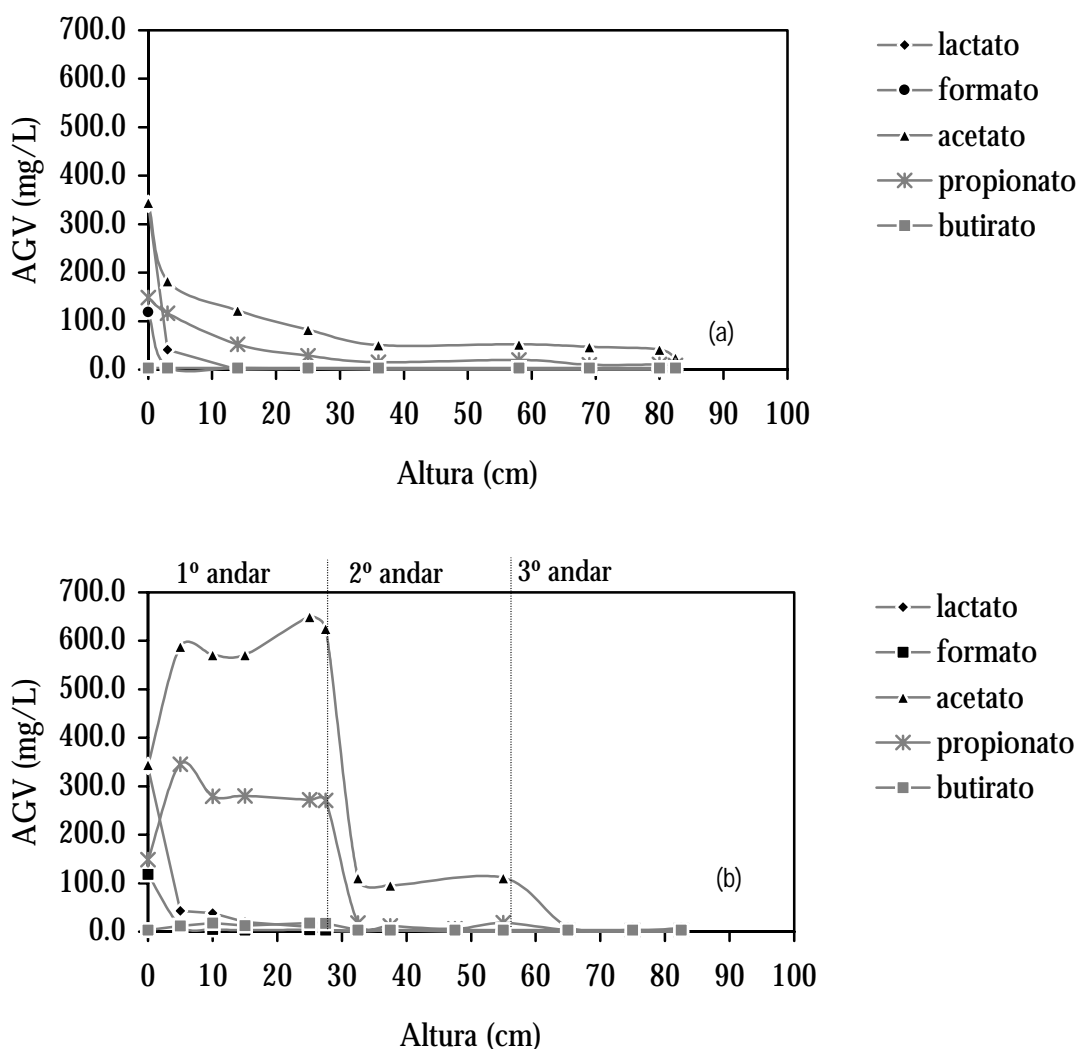


Figura 3.19 Perfis de AGV em FAI (a) e FAII(b) durante a operação com TRH igual a 2 dias e concentração média à entrada de 6000 mg CQO/L.

Para a concentração média de entrada de 9000 mg CQO/L (Figura 3.20) detectou-se uma nítida produção de acetato e propionato na base de FAI, mas o lactato e o formato continuaram a ser degradados imediatamente a seguir à entrada do digestor, pelo menos aparentemente.

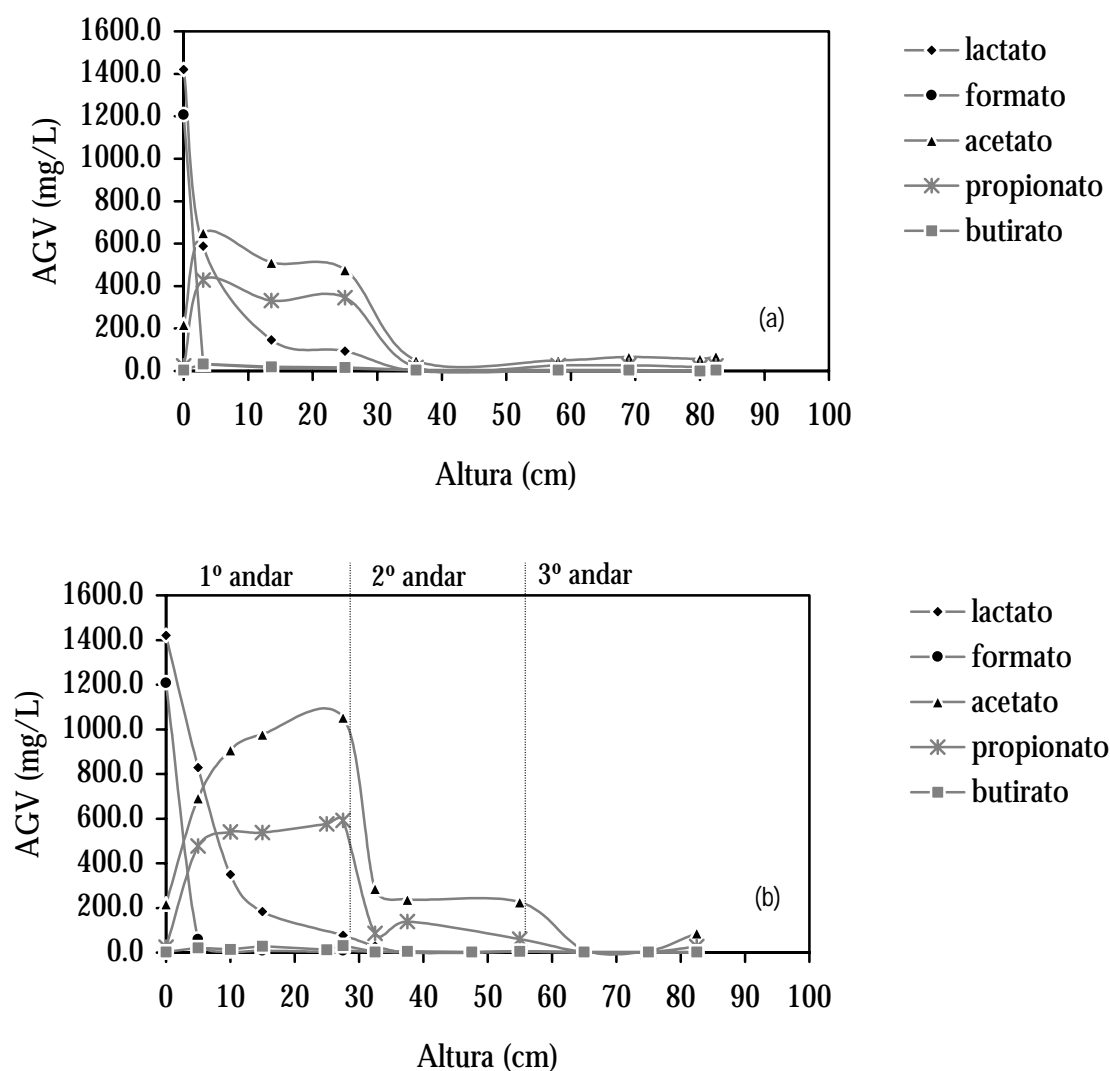


Figura 3.20 Perfis de AGV em FAI (a) e FAII(b) durante a operação com TRH igual a 2 dias e concentração média à entrada de 9000 mg CQO/L.

O formato foi degradado mais rapidamente do que o lactato e os níveis de butirato foram muito baixos. A partir de 35 cm de altura do digestor, os valores de AGV permaneceram invariantes e iguais aos valores de saída. Este facto parece mais uma vez ser devido a efeitos de mistura e não a ausência de conversão. Os níveis de butirato continuaram a ser residuais.

Durante a operação com concentração de entrada de 12 000 mg CQO/L (Figura 3.21) os teores de AGV em FAII foram significativamente superiores aos verificados em FAI.

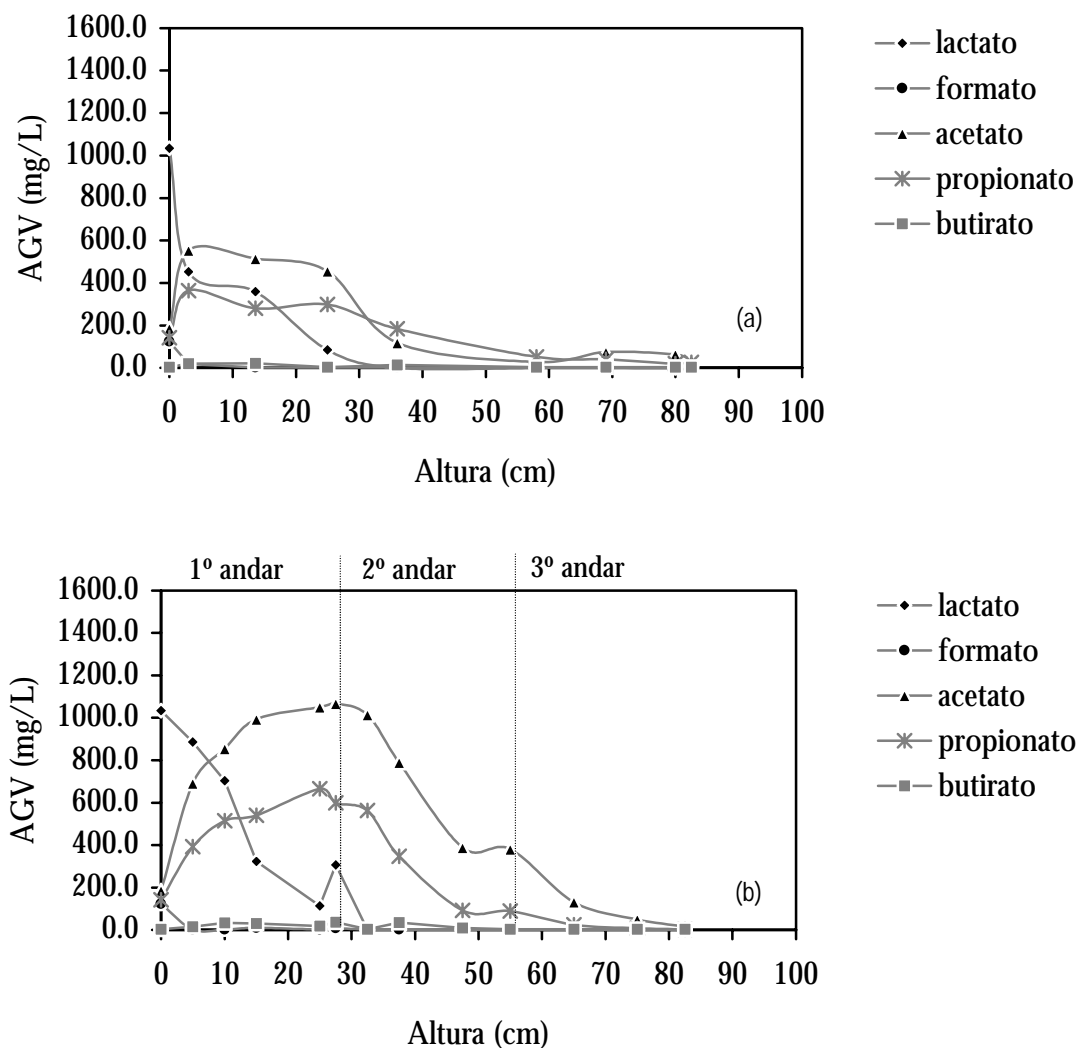


Figura 3.21 Perfis de AGV em FAI (a) e FAII(b) durante a operação com TRH igual a 2 dias e concentração média à entrada de 12 000 mg CQO/L.

Este facto é devido à menor mistura ou à mistura num menor volume e só terá consequências nefastas para as populações envolvidas, se não houver uma segregação das mesmas. Assim, se no 1º andar estiver uma população mais acidogénica, os elevados teores de AGV aí verificados não serão tão problemáticos do que se estivesse também presente uma população metanogénica como deve ocorrer no digestor não segmentado. Por outro lado, os elevados níveis de acetato e propionato à entrada do 2º andar induzirão aí o desenvolvimento preferencial de uma população sintrófica e acetoclástica. A distribuição

das populações acidogénica, sintrófica, acetoclástica e hidrogenofílica constituem o assunto do próximo sub-Capítulo.

3.4.3.4 Caracterização biológica da biomassa - actividade metanogénica e observações microscópicas

Para as concentrações de entrada de 3000 e 9000 mg CQO/L, removeram-se amostras dos sólidos presentes na base, meio e topo de FAI e à entrada de cada andar de FAII. Nessas amostras determinaram-se as actividades metanogénicas acetoclástica, hidrogenofílica, em propionato e em butirato. Determinou-se ainda a actividade acidogénica em lactose e mediu-se a área projectada dos agregados, a sua velocidade de sedimentação e a dimensão fractal que está relacionada com a rugosidade da superfície dos agregados.

O volume de sólidos retirado permitiu estimar a concentração de sólidos oclusos presentes nas várias secções dos digestores, verificando-se que, em média, a quantidade de biomassa retida em ambos os digestores foi muito semelhante (Tabela 3.16). No entanto, no topo de FAI observou-se sempre uma maior concentração de biomassa, provavelmente devido ao maior acesso de substrato por efeito de mistura. O crescimento da biomassa em FAII foi superior ao verificado em FAI, embora as diferenças sejam apenas de 24%. Apesar de se dever considerar a hipótese de uma amostragem deficiente e não representativa de toda a biomassa oclusa presente, pode sugerir-se que o menor crescimento de biomassa em FAI está relacionado com o maior rendimento em metano verificado nesse digestor, relativamente a FAII (Figura 3.9). Embora as diferenças sejam inferiores aos intervalos de confiança associados e portanto não significativas, essa hipótese seria indicativa de que em FAII teria havido um desvio da remoção de CQO no sentido da formação de biomassa e não de metano. Este facto poderia explicar também a maior concentração de sólidos observada à saída de FAII para a concentração de 12 000 mg CQO/L (Figura 3.8).

Um aspecto que convém realçar é que a biomassa removida representa apenas a fracção oclusa. No **Capítulo 4**, são apresentados dados de crescimento e distribuição no suporte da biomassa num filtro anaeróbio que revelaram que, nas mesmas condições de concentração, tipo de substrato e utilizando o mesmo material de suporte, a fracção de biomassa aderida

atingiu cerca de 40% da biomassa total retida, embora também tenha sido evidenciado que essa fracção foi dependente do tempo de operação e da presença de nutrientes.

Tabela 3.16 Distribuição de sólidos voláteis oclusos em FAI e FAII para concentrações à entrada de 3 e 9 g CQO/L.

CQO à entrada		sólidos voláteis oclusos (g/L) (\pm intervalo com 95% de confiança)		%SV/ST	
		3 g/L	9 g/L	3 g/L	9 g/L
FAI	base	5.0 \pm 0.60	17.1 \pm 1.1	76.9	82.7
	meio	3.0 \pm 0.1	9.7 \pm 0.2	73.7	53.6
	topo	0.7 \pm 0.1	5.2 \pm 0.6	73.5	59.5
	média	2.9\pm0.6	10.7\pm1.2		
FAII	1º andar	5.9 \pm 0.4	16.1 \pm 1.5	77.9	73.0
	2º andar	2.4 \pm 0.3	17.5 \pm 0.1	70.2	48.9
	3º andar	0.2 \pm 0.13	3.8 \pm 0.1	74.4	58.7
	média	2.8\pm0.5	12.5\pm1.5		

O conteúdo em sólidos fixos (não voláteis) variou entre 22.1 e 29.8% nos sólidos removidos durante a operação com concentração de 3000 mg CQO/L, apresentando um valor mínimo na base de ambos os digestores. Esta tendência foi acentuada na operação com CQO de 9000 mg/L, onde se verificou um aumento entre 17.3 e 40.5% e entre 27.0 e 41.3% da base para o topo de FAI e FAII respectivamente. Isto sugere uma maior acumulação de precipitados inorgânicos nas secções superiores dos digestores.

Na Figura 3.22 está representada a actividade acetoclástica ao longo da altura de FAI e de FAII, para as duas condições operatórias referidas. Verificou-se que, para a concentração de 3 g CQO/L, FAII seleccionou uma população com maior actividade acetoclástica no 1º e 2º andares comparativamente com a actividade acetoclástica nas secções da base e do meio de FAI. O máximo de actividade acetoclástica foi obtido para ambas as configurações na secção do meio e, no topo, registou-se um decréscimo desta actividade. Contudo, no topo de FAI a actividade acetoclástica foi superior à verificada no 3º andar de FAII o que se pensa ser devido ao maior acesso relativo de substrato por efeito de mistura. É relevante que no topo dos digestores se tenha detectado actividade metanogénica acetoclástica, apesar de se ter concluído que o acesso de substrato era baixo, em especial no 3º andar de FAII onde a concentração média de entrada, nestas condições operatórias, era 73 \pm 14 mg/L.

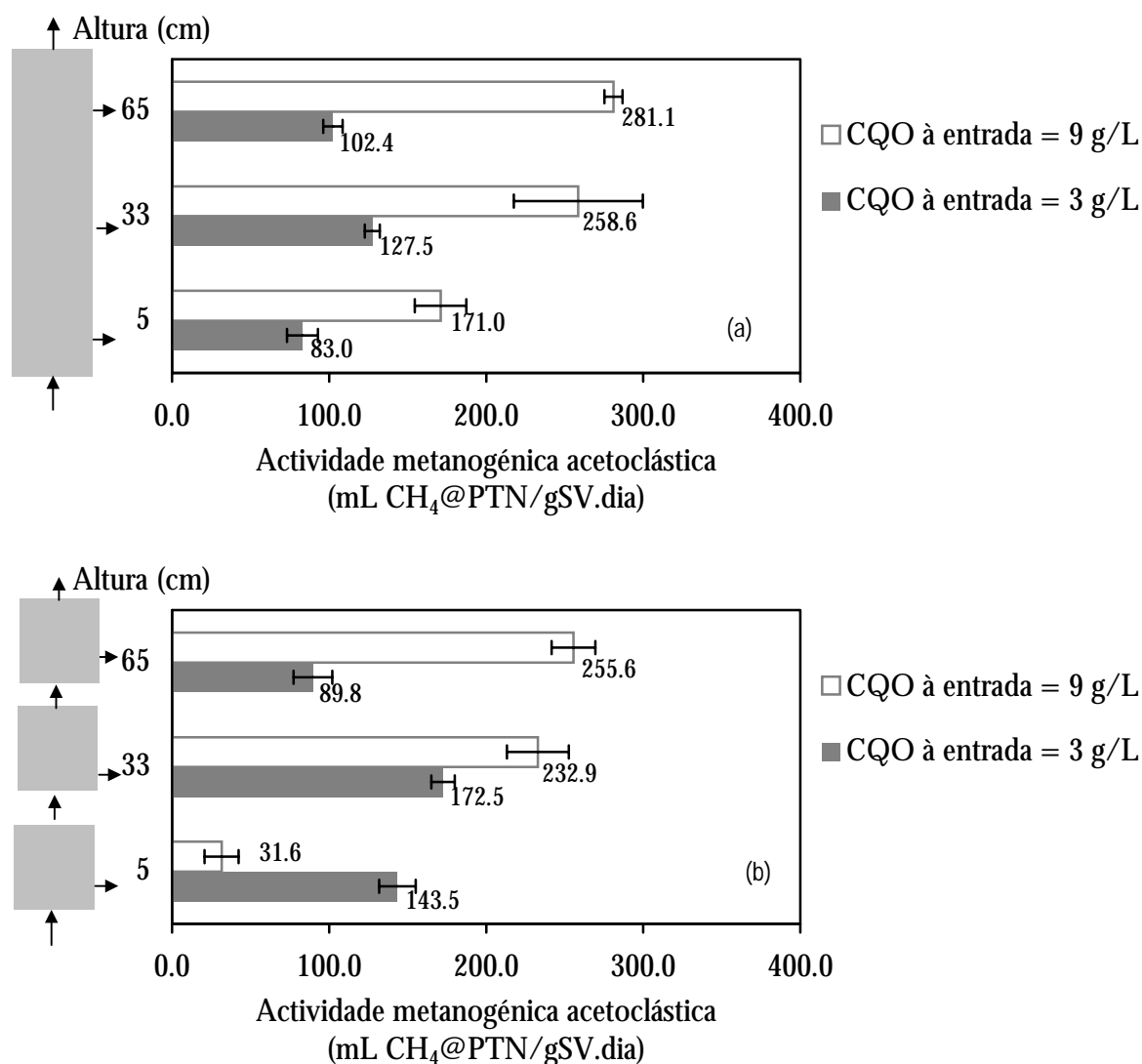


Figura 3.22 Distribuição da actividade metanogénica acetoclástica em FAI (a) e FAII (b) para concentrações à entrada de 3 e 9 g CQO/L.

Para a concentração de entrada de 9000 mg CQO/L verificou-se uma estratificação da actividade acetoclástica em ambos os digestores, embora mais acentuada em FAII (Figura 3.22). No primeiro andar deste digestor mediou-se uma actividade acetoclástica muito baixa que se pensa ser devida à diluição das bactérias metanogénicas com biomassa acidogénica, tal como descrito por outros autores para digestores segmentados (GUIOT *et al.*, 1995, VAN LIER *et al.*, 1996). No entanto, observando a Figura 3.23 e a Figura 3.24, em que se representa a actividade hidrogenofílica e a actividade acidogénica em lactose, conclui-se que, de facto, a actividade acidogénica em lactose aumentou na base dos digestores, mas que a actividade hidrogenofílica não sofreu diluição, verificando-se um aumento desta actividade

da base para o topo dos digestores. Para a concentração de 3 g CQO/L e à semelhança do que sucedeu com a actividade acetoclástica, a actividade hidrogenofílica foi superior no 1º e 2º andares de FAII do que nas secções da base e do meio de FAI.

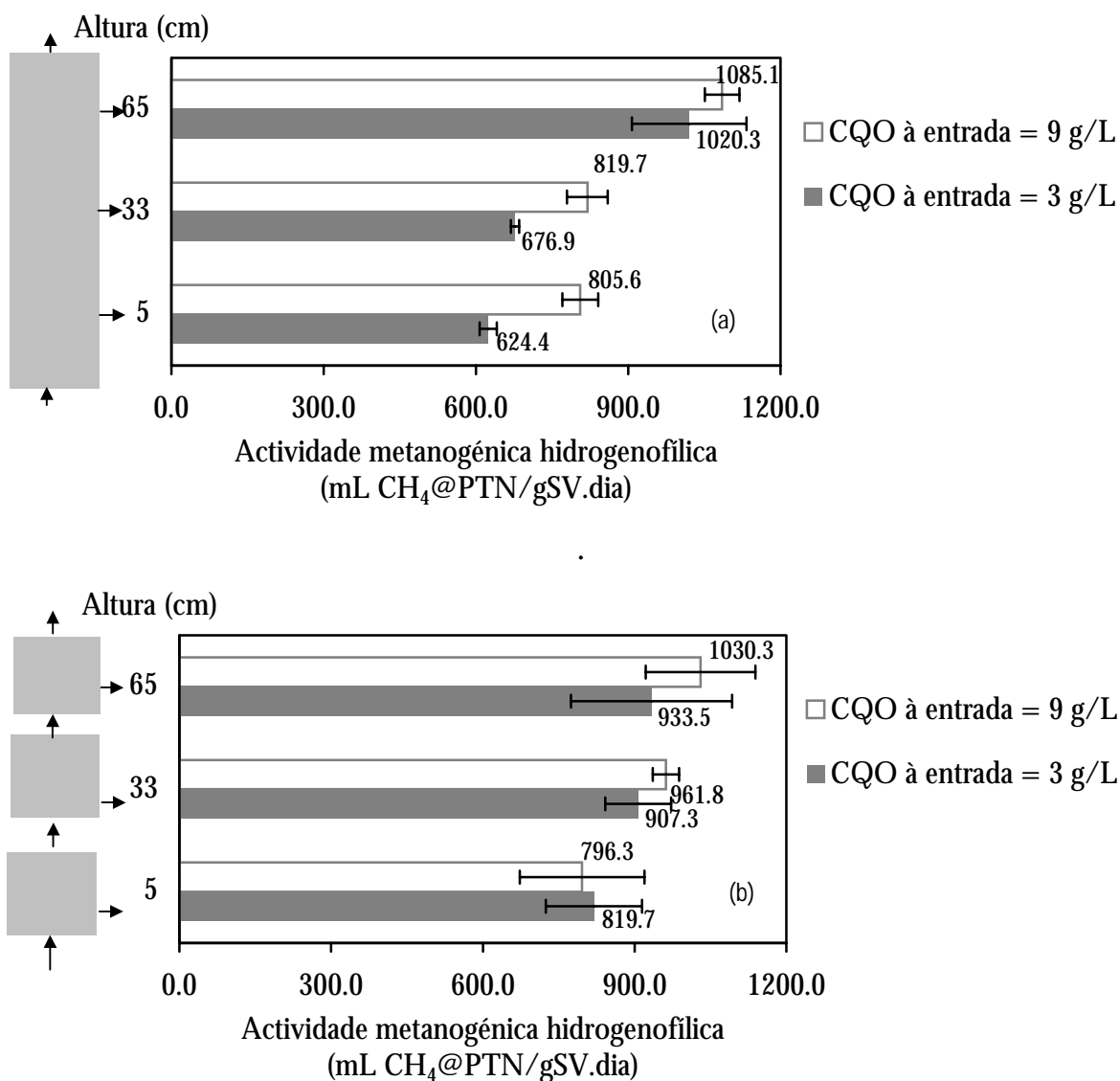


Figura 3.23 Distribuição da actividade metanogénica hidrogenofílica em FAI (a) e FAII (b) para concentrações à entrada de 3 e 9 g CQO/L.

Uma actividade hidrogenofílica elevada é importante para assegurar que possam ser criadas condições de sintrofia com as bactérias acetogénicas, produtoras de hidrogénio.

Com o aumento da concentração à entrada, a actividade acidogénica em lactose expandiu-se a todas as secções de ambos os digestores (Figura 3.24), o que é particularmente curioso no caso de FAII, dado que os perfis de CQO e AGV anteriormente

apresentados, indicavam que todo o substrato estava acidificado à entrada do 3º andar, nestas condições operatórias (Figura 3.16 (b)). A actividade em lactose foi mais estratificada em FAII do que FAI e, para a concentração de 9000 mg CQO/L, a actividade específica em lactose foi, em média, superior em FAI do que em FAII.

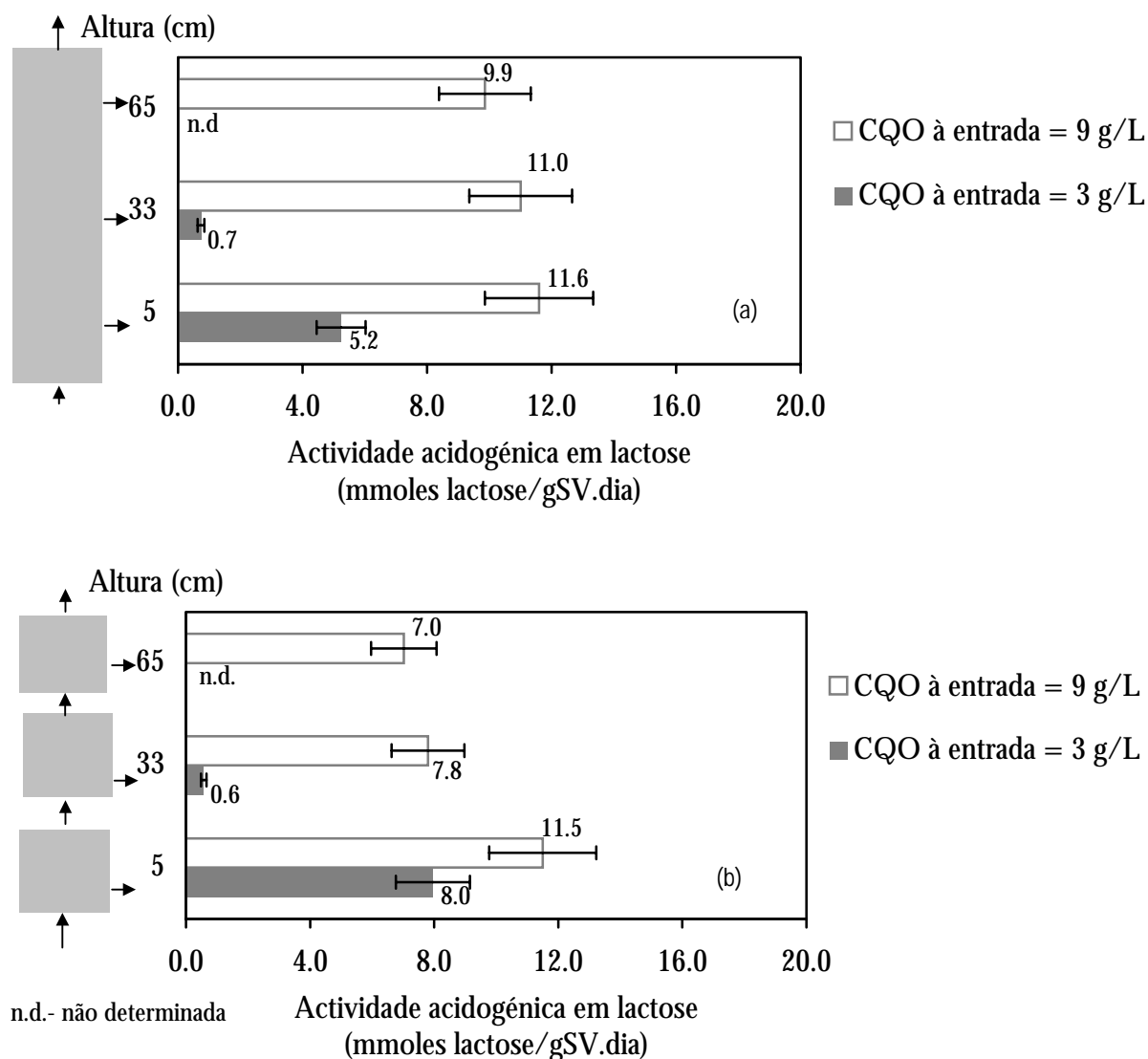


Figura 3.24 Distribuição da actividade acidogénica em lactose em FAI (a) e FAII (b) para concentrações à entrada de 3 e 9 g CQO/L.

Apesar do aumento da actividade em lactose nas secções superiores dos digestores, não se verificou, nessas secções, a referida diluição da actividade acetoclástica ou hidrogenofílica, o que sugere que o crescimento destas bactérias compensou o crescimento das bactérias acidogénicas.

Os dois géneros conhecidos de bactérias metanogénicas acetoclásticas, *Methanosarcina* e *Methanosaeta* (ex *Methanothrix*), têm diferentes afinidades para o acetato, diferentes taxas específicas de crescimento e diferentes especificidades de substratos. Enquanto *Methanosarcina* é metabolicamente versátil podendo utilizar vários substratos incluindo H_2/CO_2 e acetato, *Methanosaeta* só é capaz de degradar acetato. HARPER E POHLAND (1986) sugeriram que a capacidade do género *Methanosarcina* utilizar múltiplos substratos lhe confere uma maior resistência e capacidade de sobrevivência. Por outro lado, estes autores referiram o efeito inibitório do H_2 na degradação do acetato por *Methanosarcina* e a preferência destas bactérias pelo H_2 relativamente ao acetato o que, segundo estes autores, é confirmado por considerações termodinâmicas. Estes aspectos parecem sugerir que, no primeiro andar de FAII e para a concentração de entrada de 9000 mg CQO/L, o género acetoclástico predominante deva ser *Methanosarcina*, apresentando contudo uma reduzida actividade em acetato. Por outro lado, e dado que o pH neste andar atingiu valores de 6.5-6.6, a susceptibilidade ao pH por *Methanosaeta* é outro aspecto a justificar a ausência das bactérias desse género, do primeiro andar de FAII. As observações em microscópio electrónico de varrimento e em microscópio óptico de fluorescência permitiram concluir que entre outras formas nomeadamente de cocos que poderiam ser *Methanosarcina*, existia uma elevada concentração de bactérias semelhantes a *Methanospirillum* (Figura 3.27 e Figura 3.28).

Na Figura 3.25 e na Figura 3.26 estão representados os valores das actividades metanogénicas em propionato e butirato. Uma vez que estes substratos não são directamente convertidos em metano, os valores obtidos só representam a actividade das bactérias sintróficas que degradam cada um desses substratos, no caso particular das actividades acetoclástica e hidrogenofílica não serem limitantes (DOLFING E BLOEMEN, 1985). Por comparação das figuras atrás mencionadas com a Figura 3.22 e Figura 3.23, constata-se que essa situação prevaleceu em todas as amostras com a única excepção da biomassa removida do 1º andar de FAII para 9000 mg CQO/L, onde a actividade acetoclástica foi inferior à actividade medida em propionato.

Para a concentração de entrada de 3000 mg CQO/L, não se detectaram variações espaciais na actividade em propionato nas secções da base e do meio dos digestores.

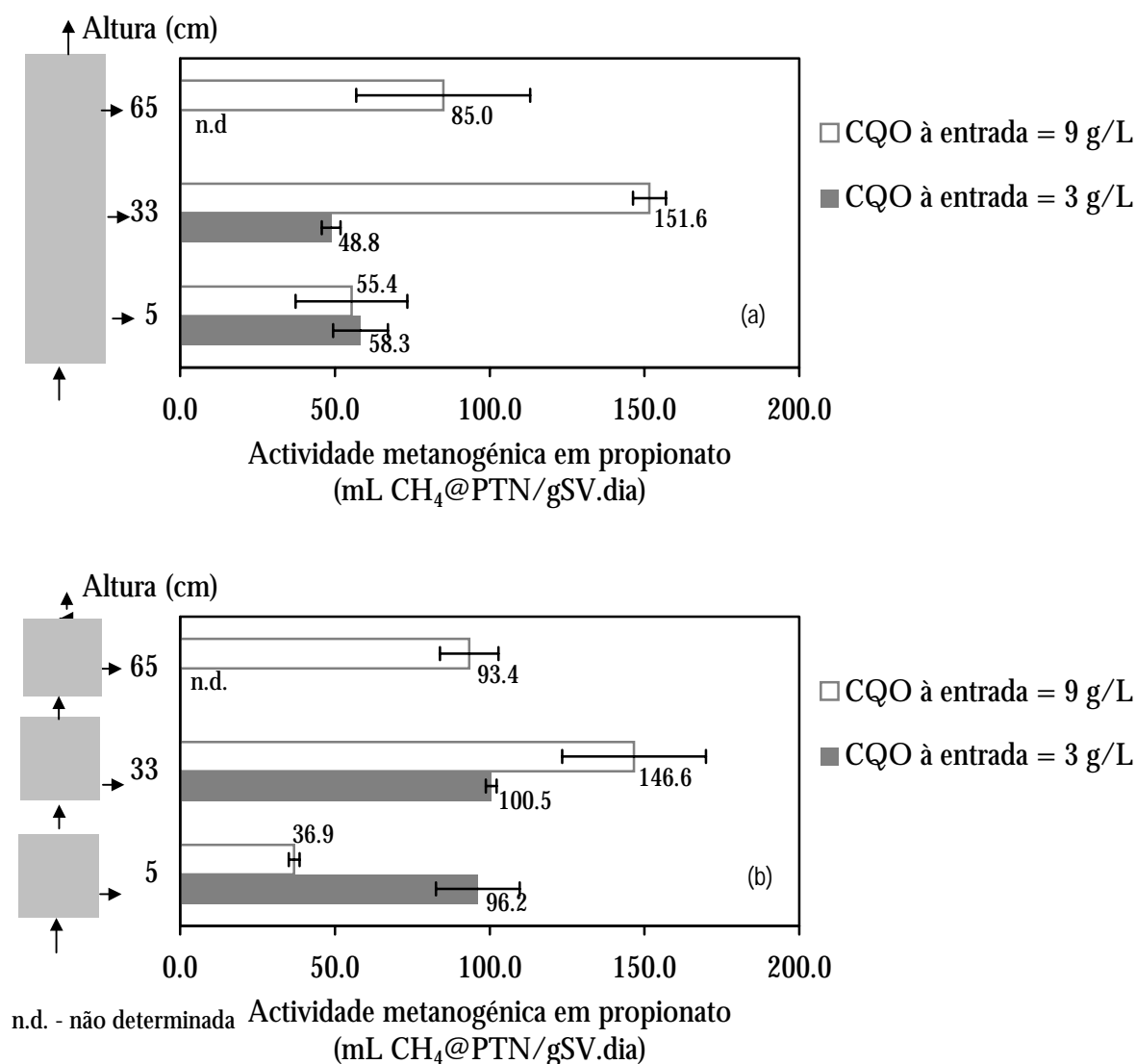


Figura 3.25 Distribuição da actividade metanogénica em propionato em FAI (a) e FAII (b) para concentrações à entrada de 3 e 9 g CQO/L.

Nas secções do topo, optou-se por não determinar as actividades em substratos indirectos, uma vez que, nestas condições operatórias, a quantidade de biomassa aí disponível era muito pequena.

É interessante verificar a distribuição da actividade em propionato em FAI e FAII para a concentração de entrada de 9000 mg CQO/L. Além da distribuição desta actividade ser extremamente semelhante para ambas as configurações, verificou-se um máximo nítido na secção do meio de FAI e no 2º andar de FAII. Este facto sugere que, nestas condições operatórias não houve um efeito notório da remoção do biogás formado nos primeiros

estágios de degradação, na distribuição da actividade em propionato, o que não comprova a sugestão de HARPER E POHLAND (1987) de que as condições de sintrofia e de metanogénese acetoclástica seriam favorecidas pela referida remoção do biogás.

A actividade em butirato foi significativamente reduzida com o aumento da concentração de entrada, notando-se um aumento da base para o topo em FAII e um máximo na secção do meio de FAI (Figura 3.26).

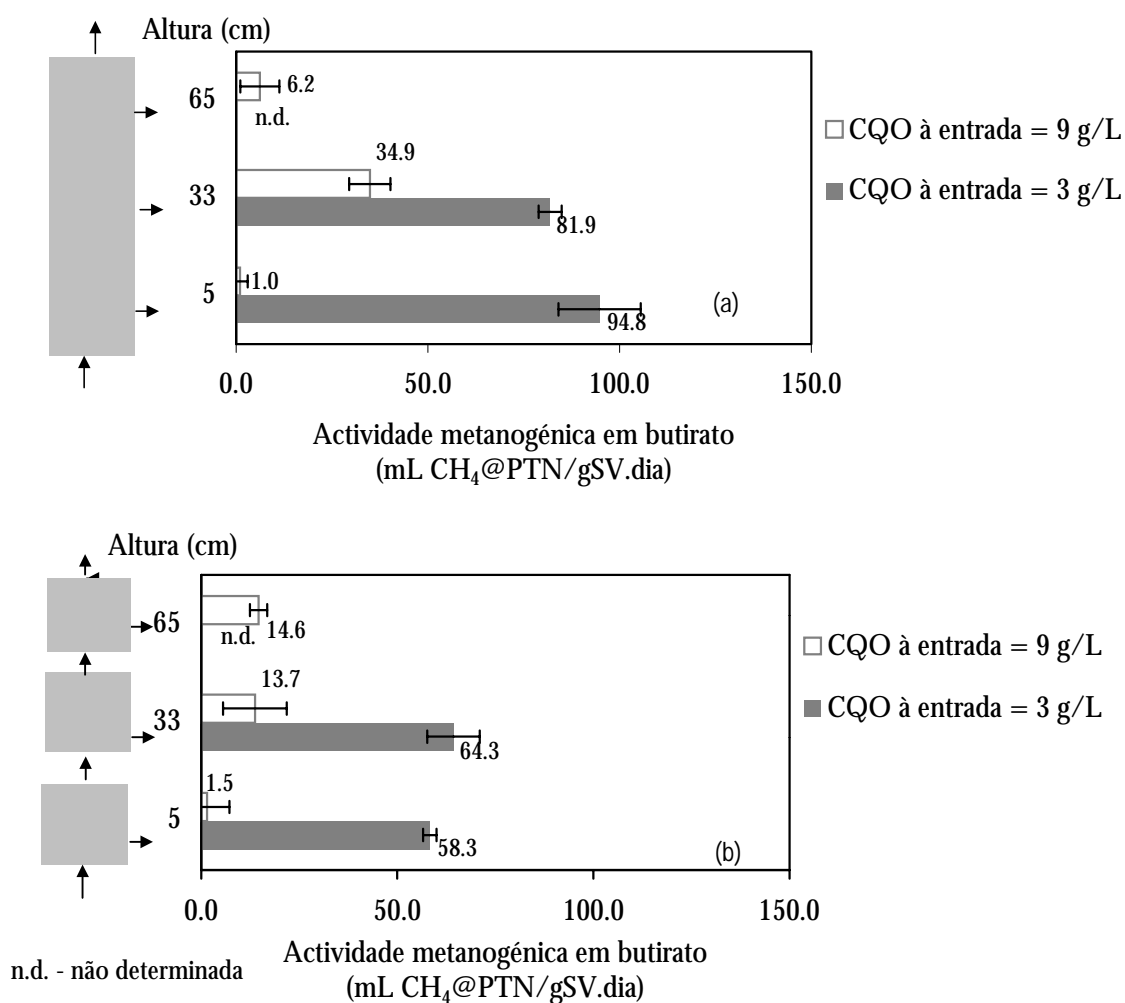


Figura 3.26 Distribuição da actividade metanogénica em butirato em FAI (a) e FAII (b) para concentrações à entrada de 3 e 9 g CQO/L.

VAN LIER *et al.* (1996) determinaram a actividade metanogénica específica em acetato, propionato e butirato num digestor segmentado do tipo manto de lamas termofílico e constatarem que a actividade em propionato era máxima nos últimos andares. Referiram

ainda que uma diminuição da actividade em propionato poderia ser devida a uma deterioração das características granulares da biomassa, afectando as relações de sintrofia.

A observação da biomassa em microscópio óptico de fluorescência permitiu comprovar a existência duma auto fluorescência de cor azul-esverdeada, característica das bactérias metanogénicas, que aumentou de intensidade com o tempo de operação (Figura 3.27 (c) e (d)). No primeiro andar de FAII foi evidente a grande abundância de bactérias semelhantes ao género *Methanospirillum* (Figura 3.27 (a)). Foram realizadas observações microscópicas em microscópio electrónico de varrimento aos agregados formados nas várias secções dos digestores de que se apresentam exemplos na Figura 3.28. O agregados de cocos podem ser *Methanosarcina*, *Methanococcus* ou *Methanobrevibacter* (HARPER E POHLAND, 1997)

(a)

(b)

(c)

(d)

Figura 3.27 Fotografias obtidas num microscópio óptico de fluorescência (a) Bactérias autofluorescentes semelhantes a *Methanospirillum* (1º andar de FAII), (b) floco com bactérias autofluorescentes, (c) biomassa no início de operação, (d) biomassa após 590 dias de operação.

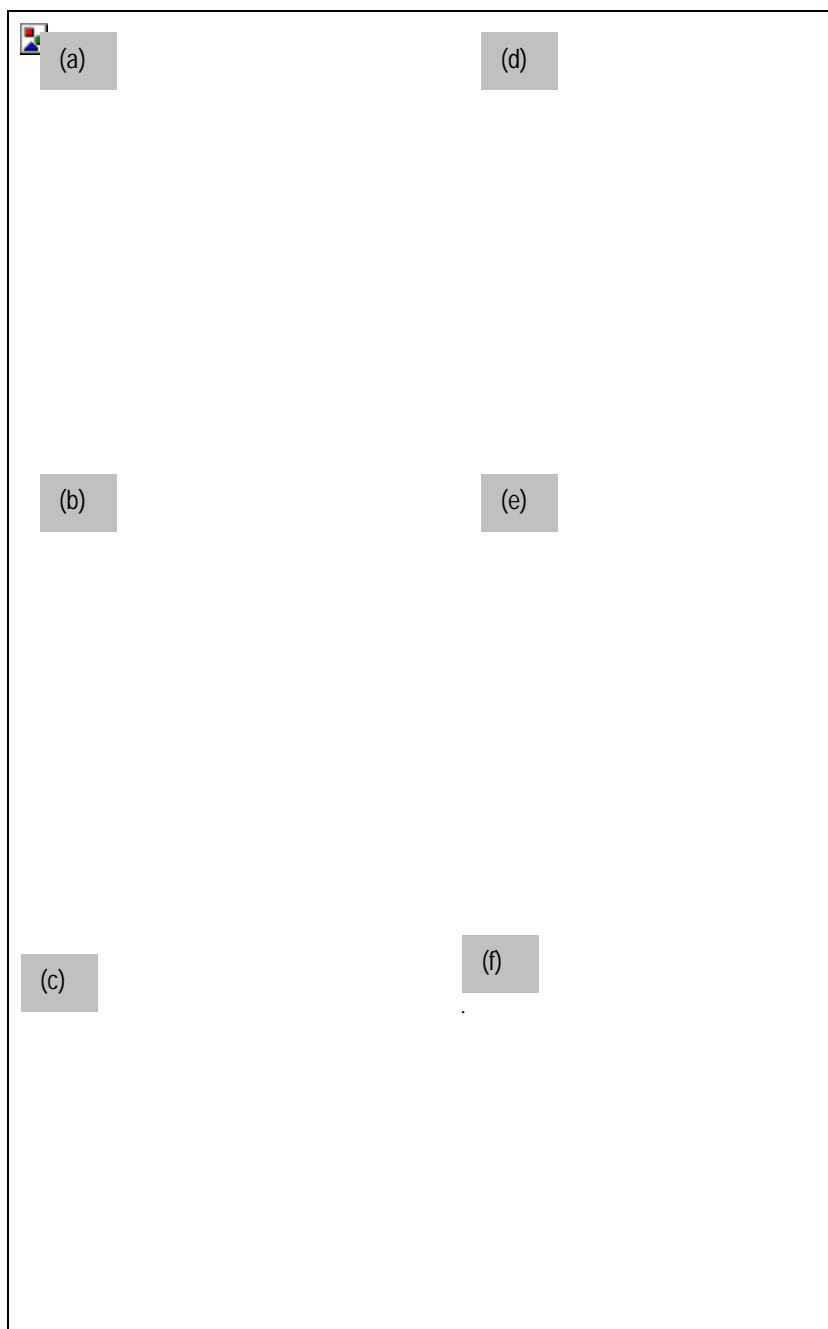


Figura 3.28 Aspecto dos agregados formados em FAI e em FAII para a concentração de entrada de 9 g CQO/L e TRH= 2 dias. (a) topo FAI, (b) meio de FAI, (c) base de FAI, (d) 3º andar de FAII, (e) 2º andar de FAII, (f) 1º andar de FAII. Em todas, com exceção da foto (e), a barra representa 10 μm . Na foto (e) a barra representa 5 μm .

Em geral, verificou-se uma diferenciação do aspecto da superfície dos agregados ao longo da altura, o que está relacionado com a estratificação da actividade. As bactérias filamentosas do tipo *Methanosaeta* abundaram no topo dos digestores.

3.4.3.5 Caracterização física dos agregados - tamanho, velocidade de sedimentação e rugosidade

Dependendo das condições operatórias, a biomassa em filtros anaeróbios tem tendência a formar agregados. As características físicas destes agregados podem condicionar a retenção da biomassa neste tipo de digestores. As características de sedimentação dos agregados microbianos, especialmente os que estão presentes na secção superior dos digestores, podem condicionar o “washout”. Se nessas secções se acumularem partículas grandes e pesadas, em princípio, será menor a probabilidade de serem arrastadas com a corrente de saída do que se forem pequenas e leves. Na Figura 3.29 está representada a distribuição do tamanho dos agregados em FAI e FAII para as concentrações de 3 e 9 g CQO/L.

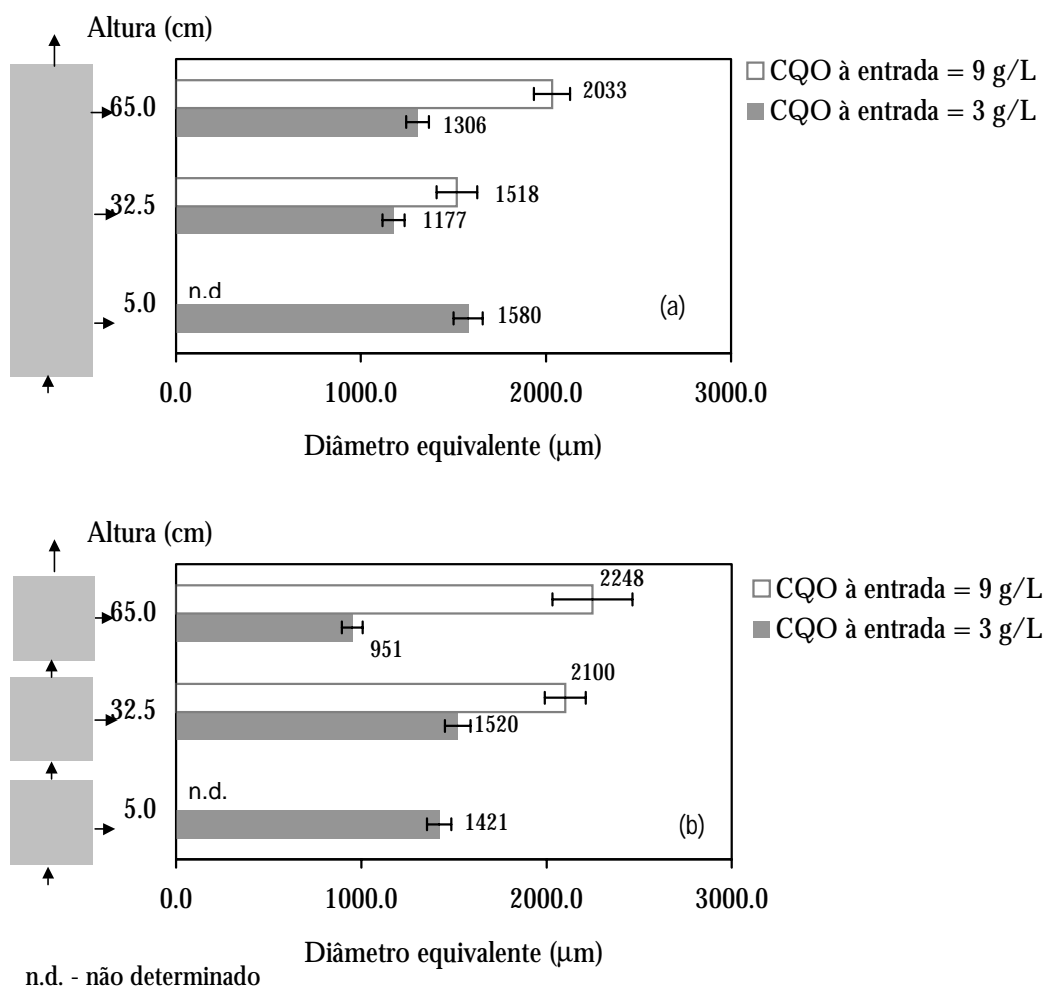
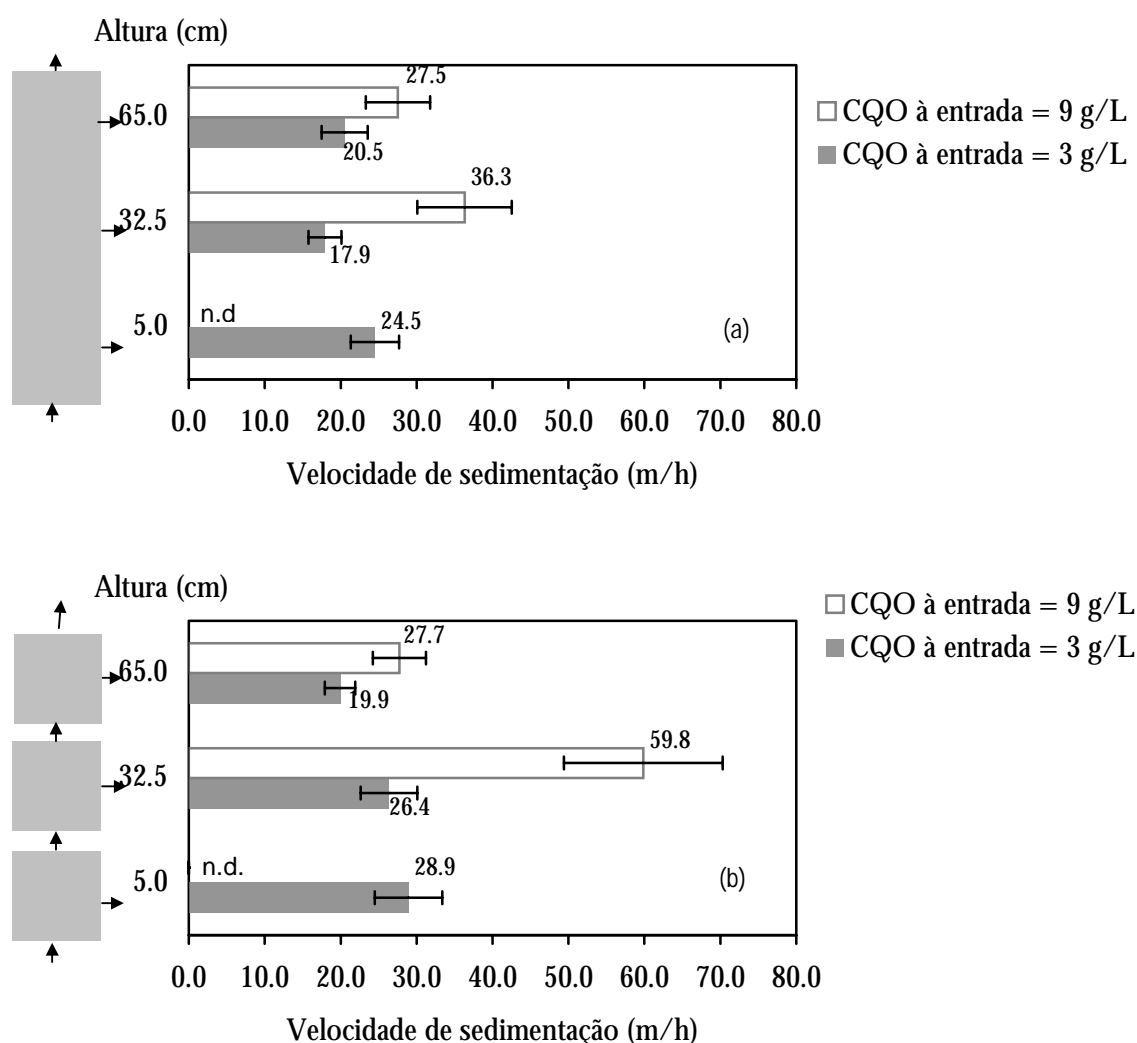


Figura 3.29 Distribuição do tamanho dos agregados em FAI (a) e FAII (b) para concentrações à entrada de 3 e 9 g CQO/L.

Pode observar-se que, para a concentração à entrada de 3 g CQO/L, os agregados eram pequenos em ambos os digestores, com tamanhos médios de 1 a 1.5 mm. Com o aumento da concentração à entrada o tamanho dos agregados aumentou significativamente, especialmente nas secções superiores, onde atingiram 2 a 2.3 mm. Em FAII os agregados presentes no último andar aumentaram para mais do dobro do tamanho que tinham para a concentração de 3 g CQO/L.

A variação da velocidade de sedimentação dos agregados está representada na Figura 3.30.



n.d.- não determinada

Figura 3.30 Distribuição da velocidade de sedimentação dos agregados em FAI (a) e FAII (b) para concentrações à entrada de 3 e 9 g CQO/L.

Para a concentração de entrada de 9 g CQO/L não foi possível medir as características físicas dos agregados na secção da base de FAI e no 1º andar de FAII, uma vez que a biomassa era uma massa quase uniforme, sem partículas individualizadas. Por comparação da Figura 3.30 com a Figura 3.29, pode observar-se que os agregados maiores, presentes nas secções superiores dos digestores para a concentração de entrada de 9 g CQO/L, não eram os que sedimentavam mais rapidamente. Este facto pode ser justificado por uma acumulação de biogás no interior das partículas. Com excepção dos agregados presentes em FAI para a concentração de entrada de 3 g CQO/L, no topo dos digestores encontravam-se os agregados com menores velocidades de sedimentação.

Para a concentração de entrada de 9 g CQO/L, os agregados presentes nas secções do meio dos digestores sedimentavam mais rapidamente, sendo relevante o valor de 60 m/h medido para os agregados do 2º andar de FAII. Este facto sugere que, nessas secções, as partículas eram mais densas. A elevada actividade em propionato registada nestas secções, pode estar relacionada com este aspecto, dado que a cooperação sintrófica entre as bactérias acetogénicas e metanogénicas é favorecida por uma associação física entre os dois grupos de bactérias, que é promovida nos agregados mais densos. De facto, verificou-se existir uma relação crescente entre a actividade em propionato e a velocidade de sedimentação das partículas (Figura 3.31).

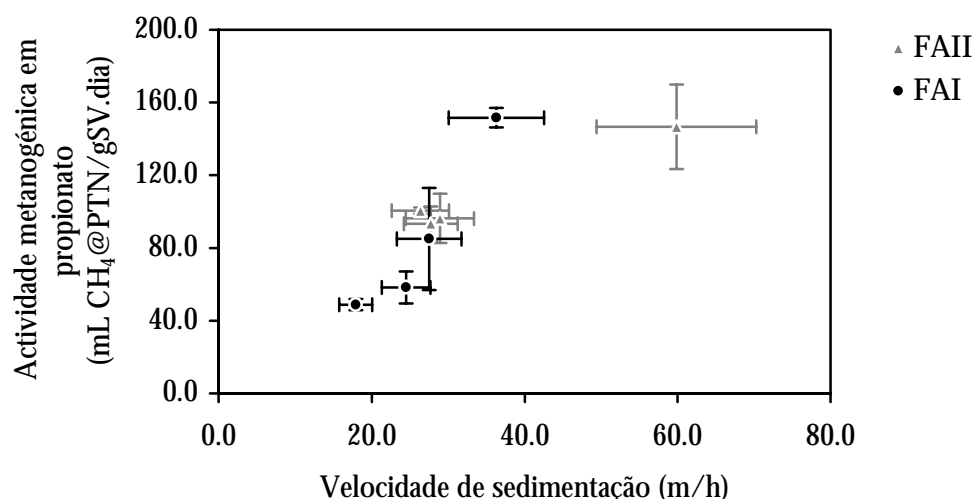


Figura 3.31 Relação entre a actividade metanogénica em propionato e a velocidade de sedimentação dos agregados microbianos presentes em FAI e em FAII.

A dimensão fractal da área projectada dos agregados presentes nas várias secções de FAI e de FAII para as duas condições de entrada consideradas está representada na Figura 3.32.

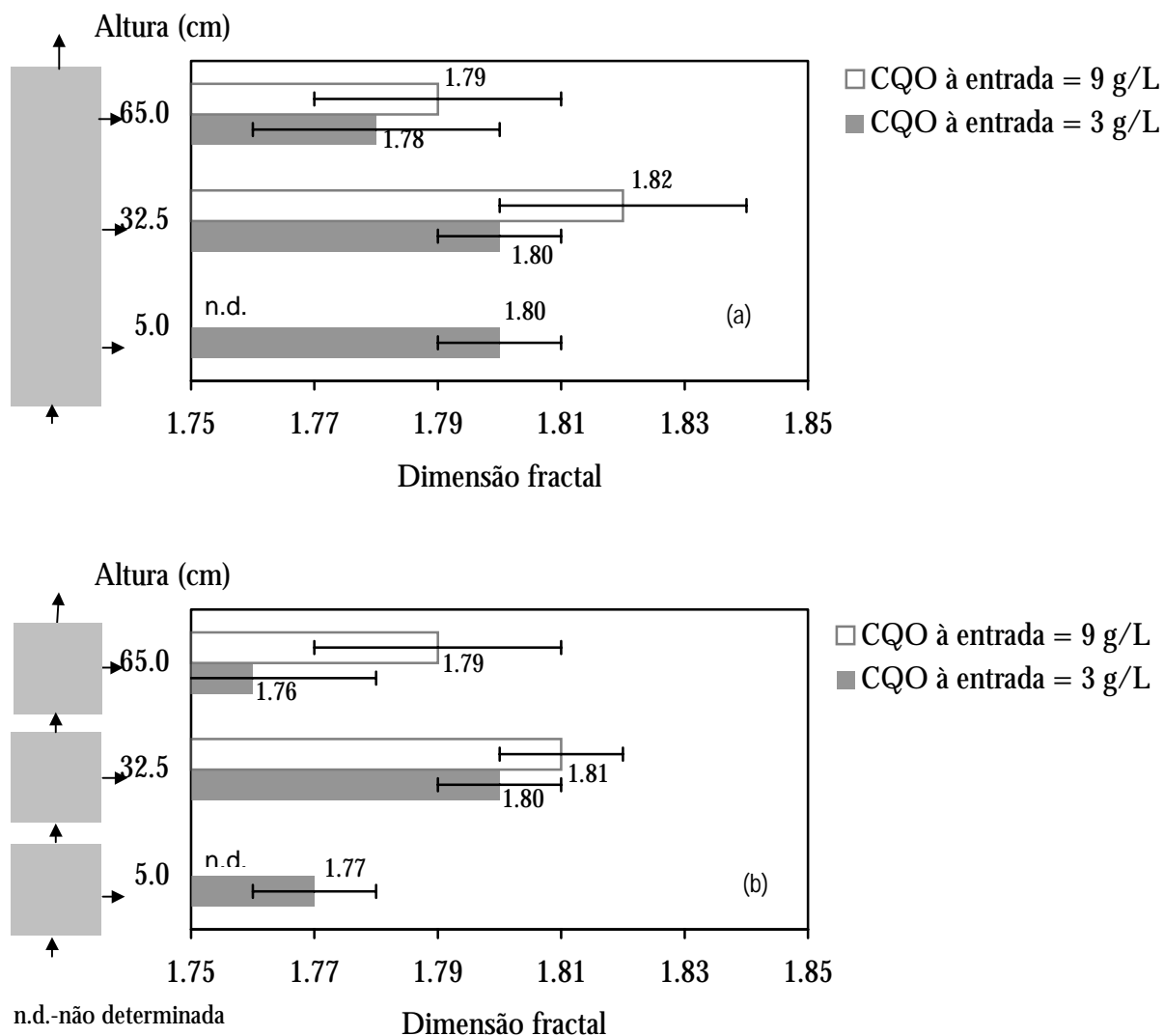


Figura 3.32 Distribuição da dimensão fractal dos agregados em FAI (a) e FAII (b) para concentrações à entrada de 3 e 9 g CQO/L.

A dimensão fractal é uma medida da rugosidade da superfície dos agregados, parâmetro importante a considerar no estudo de agregados microbianos e biofilmes, dado que afecta o ambiente hidrodinâmico da interface fluido-partícula e a área disponível para os processos de transporte, adsorção ou permuta (ZAHID E GANCZARCKZYK, 1994). A rugosidade da superfície dos agregados reflecte as condições hidrodinâmicas em que foram formados (LI E GANCZARCKZYK, 1989). Este parâmetro foi utilizado para diferenciar agregados floculentos e

granulares presentes em digestores anaeróbios. Utilizando o método da contagem das caixas (*box counting*) aplicado individualmente a cada partícula, determinaram-se dimensões fractais médias de 1.90 ± 0.02 para os flocos e 1.95 ± 0.01 para os grânulos (\pm intervalo com 99% de confiança). Utilizando um método baseado em relações *Área versus Diâmetro de Feret* obtiveram-se valores de 1.84 ± 0.13 e 2.14 ± 0.08 (\pm intervalo com 99% de confiança) para os flocos e para os grânulos respectivamente (BELLOUTI *et al.*, 1997). Agregados mais rugosos possuem dimensões fractais menores e agregados menos rugosos possuem dimensões fractais mais próximas da dimensão euclidiana 2.

Por comparação da Figura 3.32 com a Figura 3.30, conclui-se que, com o aumento da concentração de entrada, os agregados tornaram-se mais densos e menos irregulares e os agregados com maior velocidade de sedimentação presentes nas secções do meio dos digestores também possuíam maior dimensão fractal, ou seja eram mais esféricos e menos rugosos, apresentando características do tipo granular. A existência de biomassa do tipo granular em filtros anaeróbios tem sido referida na literatura (YOUNG E MCCARTY, 1967, SOTO *et al.*, 1992).

Comparando os valores obtidos para as duas configurações conclui-se que, de um modo geral, os agregados de FAI eram menos rugosos do que os de FAII, o que pode ser devido ao efeito das maiores velocidades superficiais de biogás. A velocidade superficial do líquido era muito semelhante para ambos os digestores. Na Tabela 3.17 estão representados os valores médios da velocidade superficial do biogás em FAI e FAII para as concentrações de entrada de 3 e 9 g CQO/L, onde se pode observar que a velocidade superficial média do biogás de FAI é cerca de três vezes superior à de FAII. A tensão de corte imposta pela maior velocidade ascensional do biogás pode induzir um efeito de alisamento das partículas, traduzido por uma maior dimensão fractal. No entanto, outros factores tais como a composição bacteriana dos agregados devem condicionar o aspecto morfológico dos mesmos, já que, nos vários andares de FAII a velocidade superficial do biogás era progressivamente decrescente e a rugosidade das partículas não variou proporcionalmente. No primeiro andar, em que a velocidade superficial era máxima, observaram-se partículas altamente irregulares (para a concentração de 3 g CQO/L) o que pode ser devido à maior actividade acidogénica aí registada. O crescimento de bactérias acidogénicas na superfície

dos agregados deteriora as suas características de sedimentação e altera o seu aspecto morfológico (HULSHOFF POL *et al.*, 1986). Para a concentração de 9 g CQO/L não foi possível determinar a dimensão fractal das partículas do 1º andar, por não se conseguirem individualizar.

Tabela 3.17 Velocidade superficial média do biogás produzido em FAI e em FAII para as condições de concentração de entrada de 3 000 e de 9000 mg CQO/L.

	Velocidade superficial do biogás (m/dia)	
	CQO à entrada =3000 mg/L	CQO à entrada =9000 mg/L
FAII-1º andar	0.55±0.05	1.29±0.07
FAII-2º andar	0.15±0.01	0.89±0.03
FAII-3º andar	0.05±0.02	0.20±0.01
média FAII	0.25±0.05	0.79±0.08
FAI	0.72±0.08	2.22±0.08

Na Figura 3.33 estão representadas imagens de agregados obtidas no sistema de análise de imagem, onde se podem observar as diferenças morfológicas entre os vários tipos de agregados analisados.

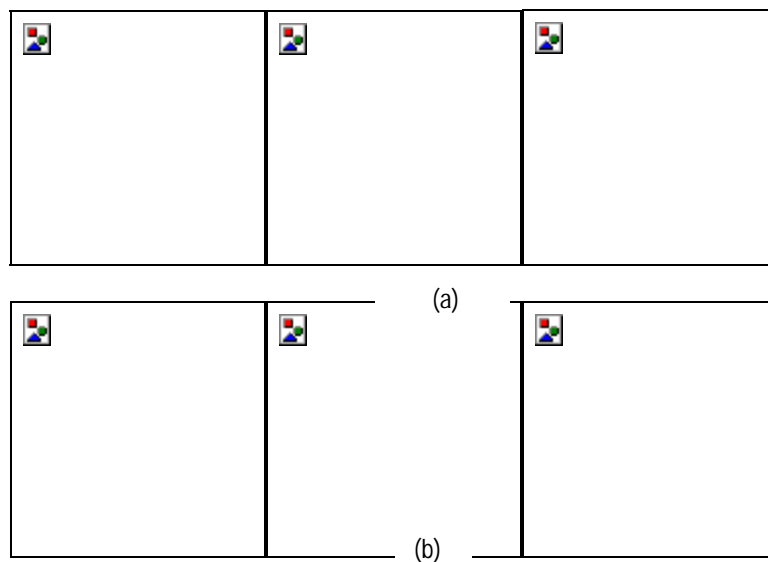


Figura 3.33 Exemplo de agregados visualizados no sistema de análise de imagem. Imagens adquiridas (a). Imagens digitalizadas (b).

3.4.3.6 Características hidrodinâmicas

Para as concentrações de entrada de 3 e 9 g CQO/L, e uma vez atingido o estado (pseudo) estacionário foram realizadas experiências de *Distribuição de Tempos de Residência (DTR)*, no sentido de conhecer o tipo de escoamento nos digestores, e avaliar as diferenças hidrodinâmicas entre as duas configurações. Apesar dos eventuais riscos de inibição com o Cloreto de Lítio, referidos no **sub-Capítulo 2.4.2.3**, página 92, decidiu-se realizar uma injeção em impulso de “*Dirac*” e não se detectaram sinais de instabilidade nos digestores. Tal como pode ser observado na Tabela 3.16 e na Tabela 3.17, entre estas duas condições operatórias, a concentração de sólidos oclusos e a produção de biogás triplicaram, o que certamente influenciou o tipo de escoamento nos digestores. O aumento da densidade e do tamanho dos agregados de biomassa também pode influenciar o tipo de escoamento.

Na Tabela 3.18 estão registados os resultados relativos à aplicação do “Modelo de Dispersão” aos dados experimentais (LEVENSPIEL, 1972), e os dados relativos à recuperação da massa de traçador e ao tempo de residência médio. O modelo de dispersão é um modelo simples com apenas um parâmetro (número de dispersão = D/uL) que permite descrever escoamento desde pistão ($D/uL=0$) até perfeitamente agitado ($D/uL=\infty$). De acordo com LEVENSPIEL, (1972), $D/uL = 0.02$ é considerado um grau intermédio de dispersão e $D/uL=0.2$ representa um elevado grau de dispersão. Os critérios de classificação foram apresentados no **sub-Capítulo 2.4.2.3**, página 92.

Tabela 3.18 Resultados das experiências de DTR em FAI e FAII para as concentrações de entrada de 3 e 9 g CQO/L - aplicação do modelo de dispersão.

	Concentração à entrada=3 g CQO/L			Concentração à entrada=9 g CQO/L		
	D/uL (coeficiente de correlação, R^2)	massa de Li^+ recuperada (%)	TRM (horas)	D/uL (coeficiente de correlação, R^2)	massa de Li^+ recuperada (%)	TRM (horas)
FAI	0.82 (0.596)	73.1	35.4	0.92 (0.858)	100.6	38.5
FAII	0.15 (0.848)	93.8	55.0	0.59 (0.975)	109.3	42.4

D-coeficiente de dispersão longitudinal, u -velocidade superficial, L -comprimento; TRM-tempo de residência médio

De acordo com esta classificação verifica-se que, no presente caso, para a concentração de entrada de 3 g CQO/L, FAI apresenta um elevado nível de dispersão e FAII um grau

intermédio de dispersão. Para a concentração de entrada de 9 g CQO/L, ambos os digestores apresentaram elevados níveis de dispersão.

Embora cada parâmetro D/uL da Tabela 3.18 represente o valor óptimo, que minimiza o somatório do quadrado dos resíduos (diferenças entre os valores experimentais e os valores do modelo), em alguns casos, esses desvios são elevados e o coeficiente de correlação afasta-se da unidade, indicando que o modelo não é apropriado para descrever o escoamento. Foram então feitas tentativas para encontrar um modelo que, embora mais complexo, descrevesse melhor o comportamento dos digestores nestas condições experimentais.

YOUNG E YOUNG (1988) propuseram um modelo com três parâmetros para descrever o escoamento dum filtro anaeróbio laboratorial onde o biogás era simulado com injeção de ar e a biomassa era simulada com um gel. Este modelo prevê a existência de uma zona perfeitamente agitada à entrada, seguida de uma zona de fluxo pistão com uma zona morta em paralelo e por último uma zona perfeitamente agitada. Considerando que τ_{a1} , τ_p , e τ_{a2} são os tempos de retenção da 1ª zona de mistura perfeita, do compartimento pistão e da 2ª zona de mistura perfeita, respectivamente, e que $(1-\beta)$ representa a fracção de volume morto da zona com escoamento pistão, pode representar-se este modelo esquematicamente do seguinte modo (Figura 3.34):

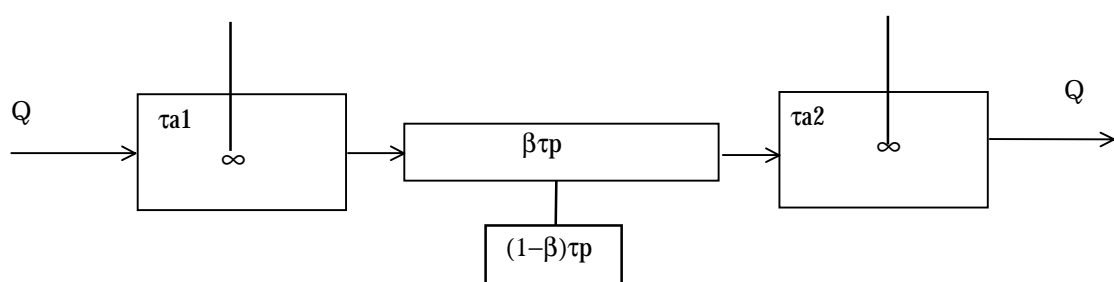


Figura 3.34 Representação do modelo de três parâmetros utilizado na modelação do escoamento nos digestores (YOUNG E YOUNG, 1988).

Dos quatro parâmetros do modelo (τ_{a1} , τ_p , β e τ_{a2}) apenas três são independentes, dado que a soma dos tempos de retenção deve ser igual ao tempo de retenção do digestor. Assim $\tau_{a1} + \tau_p + \tau_{a2} = V/Q$ em que V é o volume total do digestor e Q é o caudal alimentado. No

Apêndice D estão deduzidas as equações dos vários modelos testados, bem como as rotinas elaboradas em *MATLAB* para cálculo dos parâmetros.

Na Figura 3.35 está representada a aplicação deste modelo aos dados obtidos nas experiências de DTR em FAI para as concentrações de entrada de 3 e 9 g CQO/L e TRH de 2 dias.

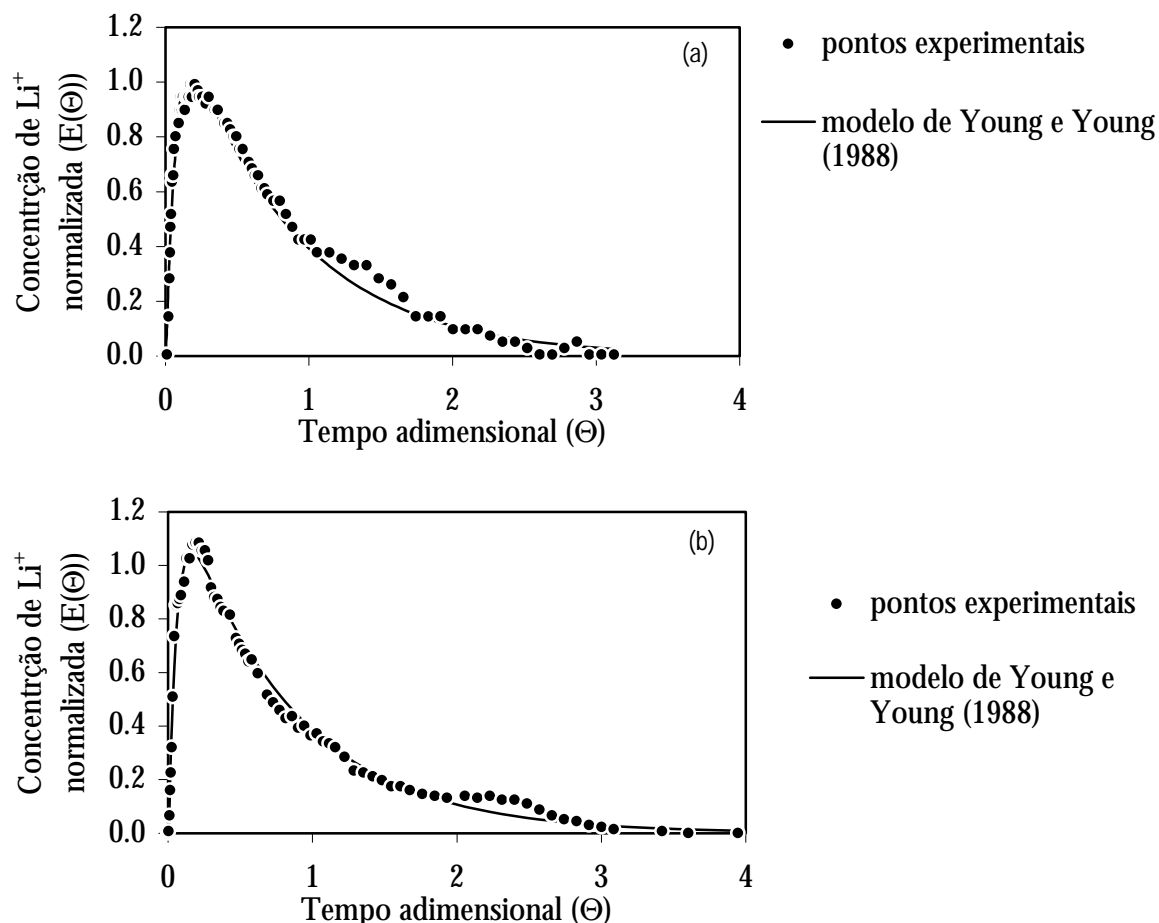


Figura 3.35 Aplicação de um modelo compartimental de três parâmetros para a descrição do escoamento em FAI para a concentração de entrada de 3 g CQO/L (a) e de 9 g CQO/L (b).

Os valores dos parâmetros do modelo nestas duas condições operatórias estão registados na Tabela 3.19, onde se pode observar que os parâmetros obtidos são muito semelhantes em ambas as situações. Em média, a zona de entrada representou cerca de 6.3% do volume total, a secção de fluxo pistão 15.4%, correspondente a cerca de 15 cm da altura do digestor, a zona morta, acoplada a este volume representou 14.9 % do volume total do sistema ou

98% do volume de fluxo pistão e, por último, os restantes 78.3% do volume são, segundo este modelo, perfeitamente agitados. Como se pode observar pela Tabela 3.19, os coeficientes de correlação aproximaram-se da unidade, se comparado com o resultante da aplicação do modelo de dispersão (Tabela 3.18).

Tabela 3.19 Resultado da aplicação do modelo compartimental de YOUNG E YOUNG (1988) na descrição do escoamento em FAI para as concentrações de entrada de 3 e de 9 g CQO/L.

	Concentração à entrada =3 g CQO/L	Concentração à entrada =9 g CQO/L
τ_{a1} (horas)	3.2	2.6
τ_p (horas)	6.7	7.7
β	0.032	0.032
τ_{a2} (horas)	36.5	36.3
<i>Coefficiente de correlação, R^2</i>	<i>0.983</i>	<i>0.992</i>

A existência de uma zona morta acoplada à secção de fluxo pistão e situada na base do digester pode ser representativa da biomassa que tem tendência a acumular-se nessa zona. A obtenção de uma fracção de volume morto tão elevada pode ser devida ao facto de se ter concentrado nessa zona todo o volume morto do sistema, incluindo zonas estagnadas, volume ocupado pela biomassa e pelo biogás. Não era esperado obter resultados tão semelhantes para as duas condições operatórias dado que o funcionamento do digester estava profundamente alterado com cerca de três vezes mais biomassa e o triplo da produção de biogás. No entanto, esta técnica estímulo-resposta não distingue entre zonas mortas hidráulicas e biológicas (GROBICKI E STUCKEY, 1992), sendo possível que para a concentração de 3 g CQO/L tenha havido zonas mortas hidráulicas por mistura ineficiente devido às baixas produções de biogás, que tenham sido substituídas por biomassa e/ou biogás quando a concentração de substrato aumentou para 9 g CQO/L.

Em FAII, embora o modelo de dispersão tenha sido aplicado com melhores resultados, testaram-se outros modelos. Assim, para a concentração de entrada de 3 g CQO/L verificou-se que o modelo dos tanques agitados em série representava bem o comportamento do digester para $J=3$ tanques (Figura 3.36). Para a concentração de entrada de 9 g CQO/L, e embora o modelo de dispersão fosse bastante adequado, a aplicação do modelo compartimental de YOUNG E YOUNG (1988) também descreveu bem o tipo de

comportamento hidráulico do digestor nestas condições, tendo a vantagem de ser o mesmo modelo que se aplicou a FAI nas mesmas condições, permitindo comparações entre os parâmetros. Na Figura 3.36 e na Figura 3.37 estão representadas as curvas experimentais obtidas para FAII e as curvas do modelo dos tanques agitados em série e do modelo de YOUNG E YOUNG (1988) aplicados para as condições de concentração de entrada de 3 e de 9 g CQO/L, respectivamente.

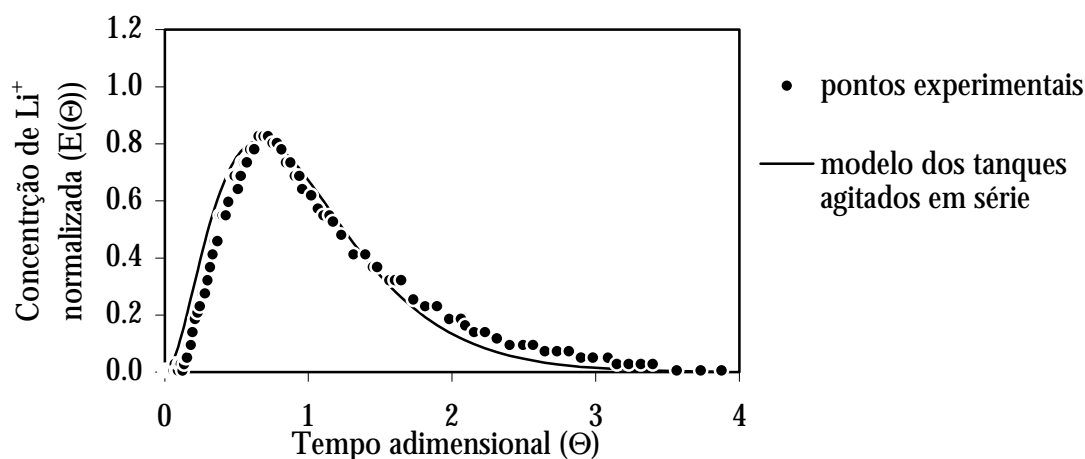


Figura 3.36 Aplicação do modelo dos tanques agitados em série para a descrição do escoamento em FAII para a concentração de entrada de 3 g CQO/L.

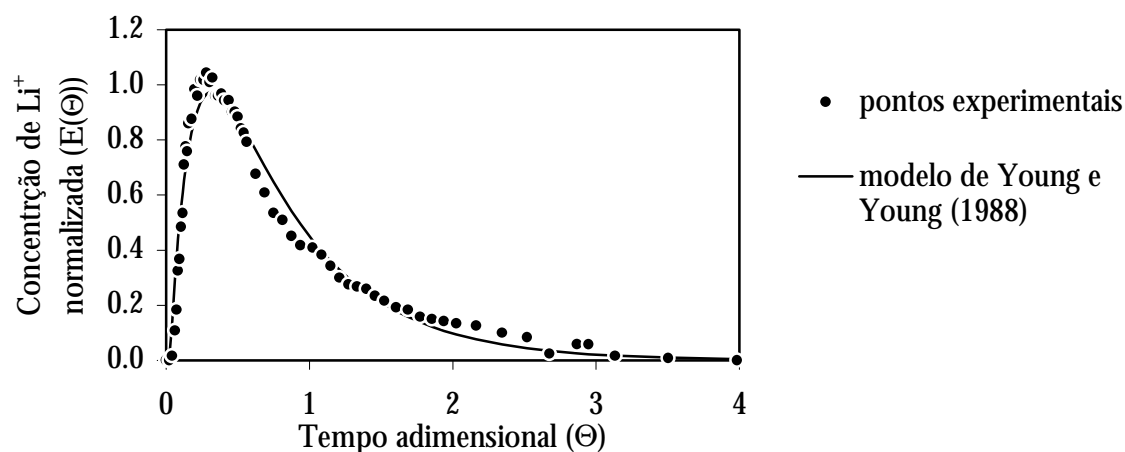


Figura 3.37 Aplicação de um modelo compartimental de três parâmetros para a descrição do escoamento em FAII para a concentração de entrada de 9 g CQO/L.

Comparando a Figura 3.36 com a Figura 3.37 pode observar-se que o tipo de escoamento foi profundamente alterado em FAII com o aumento da concentração de

entrada. Tal como já tinha sido referido na Tabela 3.18, o tempo de residência médio baixou de 55.0 para 42.4 horas e a dispersão axial aumentou significativamente. Na Tabela 3.20 estão registados os valores dos parâmetros resultantes aplicação dos modelos referidos.

Tabela 3.20 Resultado da aplicação do modelo dos tanques agitados em série e do modelo compartimental de YOUNG E YOUNG (1988) na descrição do escoamento em FAII para as concentrações de entrada de 3 e de 9 g CQO/L, respectivamente.

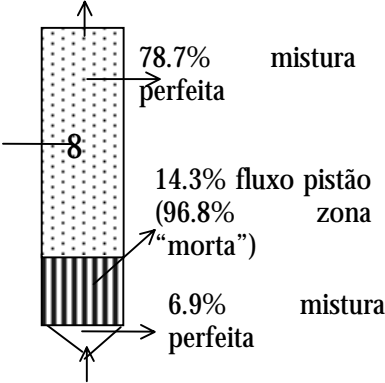
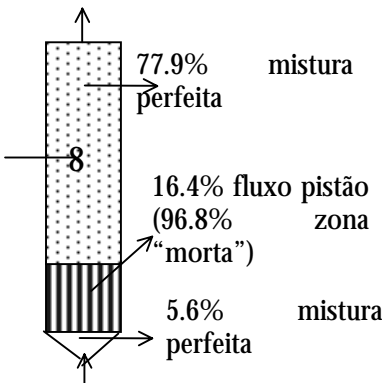
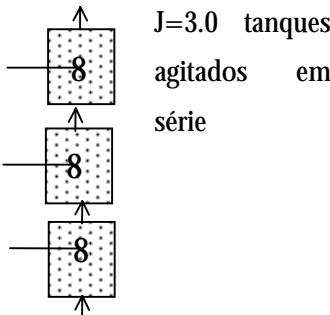
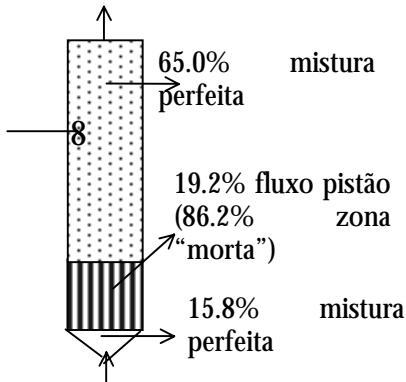
	Concentração à entrada =3 g CQO/L	Concentração à entrada =9 g CQO/L
τ_{a1} (horas)	-	7.6
τ_p (horas)	-	9.2
β	-	0.138
τ_{a2} (horas)	-	31.2
nº de tanques, J	3.0	-
<i>Coefficiente de correlação, R²</i>	<i>0.923</i>	<i>0.962</i>

Para a concentração de 9 g CQO/L a diferença entre o tipo de escoamento de FAI e de FAII não é muito significativa, tal como pode ser constatado pela comparação dos parâmetros obtidos (Tabela 3.19 e Tabela 3.20). Resumidamente, o tipo de escoamento em FAI e FAII pode representar-se de modo esquemático tal como apresentado na Tabela 3.21. Apesar do aspecto realista do esquema, convém sublinhar que apenas representa a tradução de modelos e não da realidade.

Os perfis de CQO e AGV ao longo da altura dos digestores, apresentados no sub-**Capítulo 3.4.3.3**, página 142, estão de acordo com o modelo de escoamento que melhor se adequou à descrição das características hidrodinâmicas. De facto, e tal como já tinha sido referido aquando da apresentação e discussão dessas curvas de propriedades ao longo da altura, existe na secção imediatamente a seguir à entrada um zona relativamente pequena onde há variação de propriedades, mantendo-se essas propriedades constantes, no restante volume, até à saída. A diferença de escoamento entre FAI e FAII foi mais nítida para a concentração de entrada de 3 g CQO/L, onde se observou um fluxo mais próximo do tipo pistão em FAII. Para a concentração de entrada de 9 g CQO/L o comportamento de FAII foi muito semelhante ao de FAI.

A preponderância do carácter de mistura nas condições operatórias testadas não foi extensível à quantidade e qualidade da biomassa desenvolvida. Assim, observou-se uma estratificação acentuada da quantidade de sólidos voláteis oclusos ao longo da altura dos digestores e também se verificou uma variação da composição do consórcio com a altura do digestor. As actividades acetoclástica e hidrogenofílica aumentaram da base para o topo, nas secções centrais a actividade sintrófica em propionato foi máxima e a actividade específica em lactose foi máxima na base dos digestores, expandindo-se a todas as secções dos mesmos quando a concentração de entrada foi de 9 g CQO/L.

Tabela 3.21 Resumo da aplicação de modelos de escoamento a FAI e FAII para as concentrações de entrada de 3 e 9 g CQO/L.

	3 g CQO/L	9 g CQO/L
FAI		
FAII		

3.4.4 Efeito do tempo de retenção hidráulico e da distribuição da alimentação no digestor segmentado. Desempenho, selecção microbiana e características hidrodinâmicas das duas configurações

3.4.4.1 Justificação da opção de multialimentar lateralmente o filtro anaeróbio segmentado

Após a operação com tempo de retenção constante de dois dias, decidiu-se aumentar o caudal alimentado. A opção de multialimentar o filtro anaeróbio segmentado foi baseada em duas considerações: o baixo pH no primeiro andar e a razão carbono/azoto, que diminuía acentuada e progressivamente ao longo dos andares.

pH

Os valores de pH que se vinham a registar à saída do 1º andar tendiam a ser inferiores a 6.5. Prevvia-se que o aumento posterior da carga orgânica neste andar tivesse efeitos adversos por diminuição acentuada do pH. Na Figura 3.38 estão representados os perfis de pH ao longo da altura de FAII para cada uma das condições operatórias anteriores.

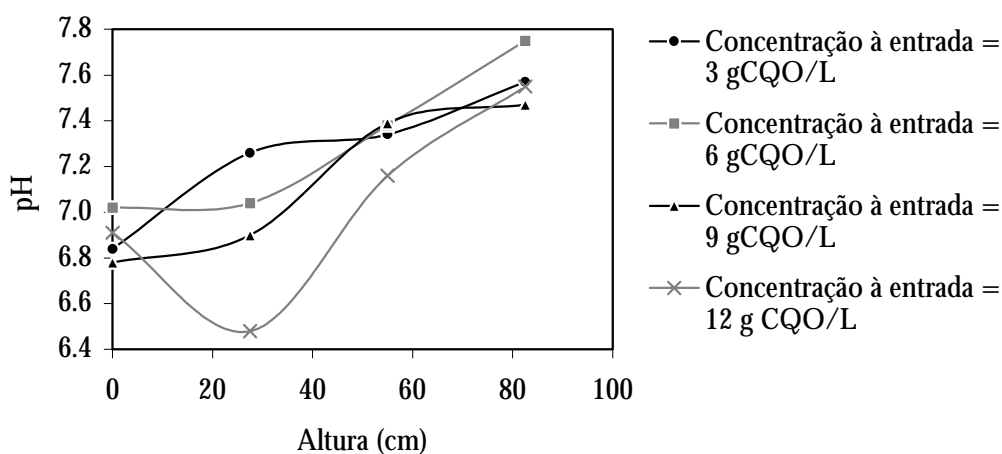


Figura 3.38 Perfis de pH ao longo da altura de FAII, durante o período de operação com tempo de retenção constante e concentração de substrato crescente entre 3 e 12 g CQO/L.

Pode observar-se que para a concentração de entrada de 12 g CQO/L o pH atingiu um valor mínimo de 6.48 à saída do primeiro andar. Face a este valor baixo de pH, decidiu-se repor a concentração de entrada em 9000 mg CQO/L, mantendo ainda o tempo de retenção em dois dias. No digestor FAI, que serviu sempre como controlo, aplicaram-se as

mesmas condições que em FAII. Entre o dia 628 e o dia 670 de operação, repuseram-se as condições de concentração à entrada de 9 g CQO/L e TRH de 2 dias que já haviam sido impostas entre os dias 495 e 596 de operação. Na Tabela 3.22 e na Tabela 3.23 estão resumidos os parâmetros operatórios entre os dias 495 e 670, onde se pode observar que, para as mesmas condições operatórias, a concentração solúvel à saída de FAII aumentou e a concentração de CQO total em FAI também não retornou aos valores originais. As produções de biogás recuperaram os valores que tinham sido anteriormente obtidos.

Tabela 3.22 Variação dos parâmetros operatórios e de desempenho de FAI na reposição da concentração de entrada em 9000 mg CQO/L (\pm intervalo com 95% de confiança).

Tempo (dias)	TRH (dias)	CQO à entrada (mg/L)	Carga Orgânica Aplicada (kgCQO/m ³ .dia)	CQO solúvel à saída (mg/L)	CQO total à saída (mg/L)	Eficiência de remoção CQO solúvel (%)	CH ₄ (%)	biogás (m ³ /m ³ .dia)
[495-596]	1.93 (± 0.01)	8837 (± 411)	4.58 (± 0.21)	157 (± 34)	973 (± 217)	98.2 (± 0.4)	62.3 (± 1.3)	2.6 (± 0.1)
[596-628]	↓	12143 (± 403)	6.29 (± 0.21)	215 (± 26)	2369 (± 254)	98.2 (± 0.3)	61.0 (± 0.4)	3.5 (± 0.1)
[628-670]		8863 (± 142)	4.59 (± 0.08)	178 (± 52)	1654 (± 424)	98.0 (± 0.6)	62.0 (± 0.6)	2.7 (± 0.1)

Tabela 3.23 Variação dos parâmetros operatórios e de desempenho de FAII na reposição da concentração de entrada em 9000 mg CQO/L (\pm intervalo com 95% de confiança).

Tempo (dias)	TRH (dias)	CQO à entrada (mg/L)	Carga Orgânica Aplicada (kgCQO/m ³ .dia)	CQO solúvel à saída (mg/L)	CQO total à saída (mg/L)	Eficiência de remoção CQO solúvel (%)	CH ₄ Média (%)	biogás (m ³ /m ³ .dia)
[495-596]	2.05 (± 0.01)	8837 (± 411)	4.31 (± 0.20)	175 (± 56)	1410 (± 407)	97.9 (± 0.7)	61.0 (± 3.2)	2.3 (± 0.1)
[596-628]	↓	12143 (± 403)	5.92 (± 0.20)	200 (± 55)	4506 (± 1677)	98.3 (± 0.5)	58.4 (± 1.3)	3.3 (± 0.1)
[628-670]		8865 (± 143)	4.32 (± 0.07)	266 (± 75)	1386 (± 673)	97.0 (± 0.9)	60.6 (± 1.9)	2.7 (± 0.1)

O pH à saída do primeiro andar aumentou até 6.8-6.9 e, a partir deste dia e até ao dia 862 de operação, não se alteraram as condições de funcionamento deste andar.

Razão CQO/N

Ao longo do período operatório anterior mediram-se os perfis de Azoto total, orgânico e amoniacal ao longo da altura dos digestores. O facto da CQO ser removida essencialmente no primeiro andar, e dado que o azoto não era removido, mas apenas transformado da forma orgânica para a forma amoniacal, conduzia à diminuição acentuada da razão CQO/N à entrada do 2º e 3º andares.

Na Tabela 3.24 estão representados os valores de Azoto *Kjeldahl*, amoniacal e orgânico ao longo da altura de FAII, nas condições operatórias referentes ao período operatório com tempo de retenção constante e concentração de substrato crescente entre 3000 e 12000 mg CQO/L. Cada valor da Tabela 3.24 representa o valor médio dos valores obtidos em amostras retiradas em dois dias consecutivos de operação.

Tabela 3.24 Transformações de azoto em FAII durante o período de operação com tempo de retenção constante e concentração de substrato crescente entre 3 e 12 g CQO/L.

Concentração à entrada (mg CQO/L)	local	Azoto Kjeldahl (mg N-NH ₄ /L)	Azoto Amoniacal (mg N-NH ₄ /L)	Azoto Orgânico (mg N-NH ₄ /L)	Razão CQO/N (mg CQO/ mg N-NH ₄)
2952	entrada	147.6	25.2	122.4	20
	saída 1º andar	136.8	114.8	22.0	3.4
	saída 2º andar	127.4	105	22.4	0.9
	saída 3º andar	127.4	98	29.4	
5831	entrada	291.6	33.04	258.6	20
	saída 1º andar	261.0	253.4	7.6	6.3
	saída 2º andar	260.6	248.4	12.2	0.8
	saída 3º andar	259.9	244.7	15.2	
8837	entrada	441.8	35.4	406.4	20
	saída 1º andar	333.9	285.3	48.6	9.7
	saída 2º andar	395.1	367.9	27.2	1.2
	saída 3º andar	400.7	380.4	20.3	
12143	entrada	600.0	40	560.0	20
	saída 1º andar	403.1	256.9	146.2	17
	saída 2º andar	571.5	506.8	64.7	2.4
	saída 3º andar	583.8	546	37.8	

A razão CQO/N à entrada do 2º andar variou entre 3 e 10 para as concentrações de entrada de 3, 6 e 9 g CQO/L. Para a concentração de entrada de 12 g CQO/L a razão

CQO/N aumentou para 17 mg CQO/mg N-NH₄ porque a degradação de substrato não foi tão eficiente no primeiro andar de FAII, tendo-se obtido um valor de CQO mais elevado à saída. À entrada do 3º andar a razão CQO/N atingiu valores de 0.8 o que representa um excesso de azoto, atendendo aos valores da literatura. De acordo com HENZE E HARREMOES (1983), o mínimo teórico da razão CQO/N é 350/7, para processos com cargas orgânicas mássicas superiores a 1 kg CQO/(kgSSV.dia).

PAN VEIRA (1991) estudou a influência da razão C/N/P na operação e nas características da biomassa desenvolvida em digestores anaeróbios de leito fixo. Verificou que a deficiência em azoto fazia aumentar a adesão de sólidos ao suporte, baixando a sua actividade metanogénica específica, provavelmente devido à produção preferencial de polímeros extracelulares. Se o efeito do excesso de azoto for o inverso, então no 2º e 3º andares de FAII deveria ter-se uma baixa produção de polímeros extracelulares, sendo aí desfavorecida a adesão ao suporte, relativamente ao primeiro andar. Como não foi retirado suporte ao longo da operação, esta hipótese não foi comprovada.

Verificou-se que o azoto orgânico era imediatamente transformado em azoto amoniacal, sendo o azoto total, em geral, decrescente ao longo do digestor. A diferença entre o Azoto Kjeldahl total (AKT) à entrada e à saída representa, essencialmente, o azoto incorporado pelas bactérias para crescimento celular. Pode considerar-se o seguinte balanço ao azoto nos digestores (DANGCONG *et al.*, 1994):

$$AKT_{\text{entrada}} = AKT_{\text{saída}} + N_{\text{utilizado}} + N_{\text{libertado no biogás}}$$

Segundo estes autores, é de esperar que, como a fracção de NH₃ no líquido é pequena a pH 7, a libertação de azoto no biogás possa ser desprezada. Se a composição da biomassa for representada pela fórmula empírica C₅H₇O₂N, produzir-se-ão 8.07 mg SSV por mg de Azoto utilizado. Sabendo o consumo de CQO correspondente à utilização de determinada quantidade de Azoto, pode determinar-se um valor para o rendimento biomassa/substrato.

No entanto, este método de determinar rendimentos biomassa/substrato é muito sensível a erros experimentais na determinação do azoto. A sequência de cálculos, envolvendo diferenças entre os valores experimentais é, por si, fonte de propagação de erros. Por outro lado, as diferenças entre os valores de AKT à entrada e à saída são, em

geral muito pequenas. No presente trabalho, para a concentração de entrada de 9000 e de 12 000 mg CQO/L não se verificou uma diminuição gradual dos valores de Azoto Total ao longo da altura dos digestores. No primeiro andar houve uma diminuição acentuada dos teores de Azoto Total, que aumentavam depois à saída do 2º e do 3º andares, atingindo contudo valores inferiores aos da entrada no digestor (Tabela 3.24). A tentativa de determinar rendimentos biomassa/substrato em cada andar de FAII com este método, não foi bem sucedida. Quando foi possível determinar esses valores, os resultados não eram consistentes. Contudo, calcularam-se valores de rendimentos biomassa/substrato em termos globais para FAI e para FAII, tendo-se obtido valores entre 0.013 e 0.062 mgSSV/mgCQO em FAII e entre 0.055 e 0.075 mg SSV/mg CQO em FAI, mas não houve nenhuma tendência definida com o aumento da concentração de substrato, nem foram justificadas as diferenças obtidas entre as duas configurações de digestor. Estes valores são no entanto da ordem de grandeza dos obtidos por DANGCONG *et al.* (1994) com o mesmo método, que se situaram entre 0.051 e 0.093 mg SSV/mg CQO.

3.4.4.2 Resultados de exploração do filtro segmentado com alimentações laterais. Comparação com a configuração tradicional.

Após se ter comprovado o baixo pH à saída do 1º andar e a baixa razão CQO/N à entrada do 2º e do 3º andar de FAII, decidiu-se diminuir o tempo de retenção por adição de uma corrente de substrato à entrada do 2º andar até observar nesse andar uma diminuição de eficiência. O critério de pH que foi aplicado no 1º andar não foi aplicado no segundo andar porque neste não se verificou uma descida acentuada de pH (ver **sub-Capítulo 3.4.4.4**, página 193). Antes do pH descer significativamente, verificou-se uma descida brusca na eficiência de 80 para 53.8%, indicando uma sobrecarga neste andar. Na Figura 3.39 (a) está representada a distribuição da alimentação nessas condições de sobrecarga no 2º andar. Após essa diminuição de eficiência, retirou-se parte da corrente alimentada no 2º andar e adicionou-se à entrada do 3º andar, ficando a alimentação distribuída pelos três andares, segundo um critério de carga máxima aplicada em cada andar (Figura 3.39 (b)). Nestas duas situações a carga orgânica aplicada no digestor foi de 13 kg CQO/m³.dia. A partir do dia 862 de operação, diminuiu-se o tempo de retenção de FAII por aumento proporcional de todas as correntes alimentadas, tendo se atingido uma carga orgânica de 20

kg CQO/m³.dia (Figura 3.39 (c)). À entrada do 2º andar aplicava-se cerca de 50% da carga orgânica total aplicada no digestor.

Em FAI as condições operatórias foram mantidas semelhantes às de FAII, mantendo uma única alimentação na base. Na Figura 3.40 estão representados os tempos de retenção dos vários andares de FAII durante este período operatório.

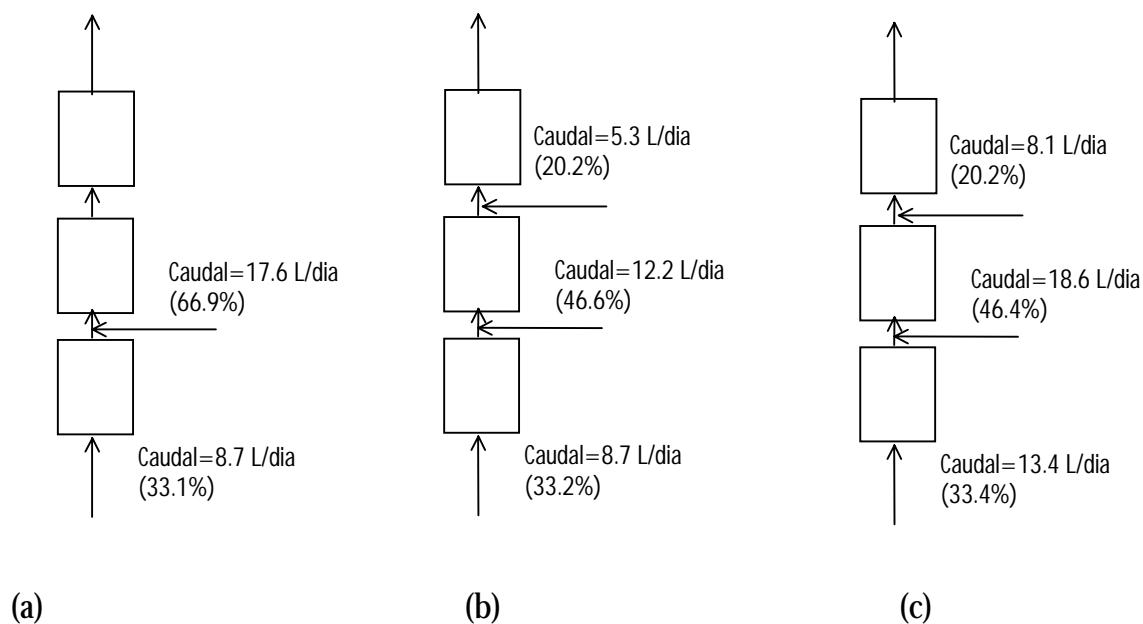


Figura 3.39 Distribuição do caudal ao longo de FAII (a) alimentação dupla com sobrecarga do 2º andar (Bv=13 kg CQO/m³.dia). (b) alimentação distribuída (Bv=13 kg CQO/m³.dia). (c) alimentação distribuída (Bv=20 kg CQO/m³.dia).

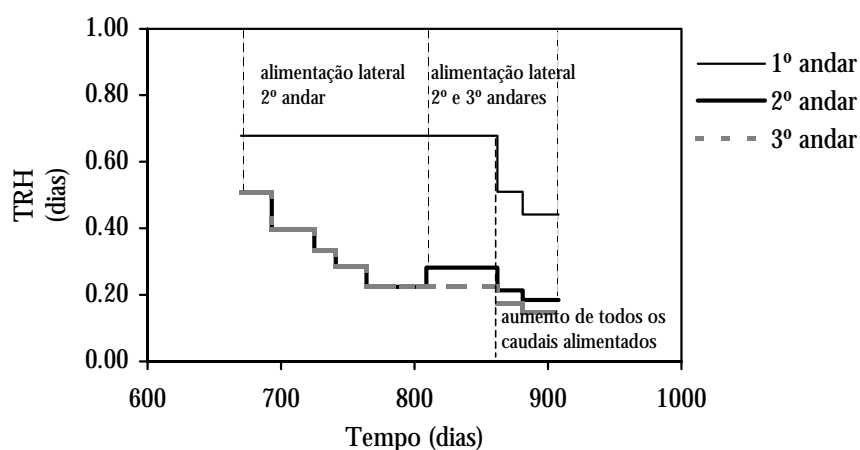


Figura 3.40 Variação do tempo de retenção hidráulica em cada andar de FAII durante o período de operação com alimentação lateral repartida.

Na Figura 3.41 estão representadas as condições operatórias e os dados de exploração de FAI e de FAII nestas condições, nomeadamente, eficiência de remoção de CQO solúvel, carga orgânica aplicada (Bv), tempo de retenção hidráulico (TRH), concentração à entrada e ácidos voláteis na corrente de saída.

Os valores médios de estado (pseudo) estacionário dos parâmetros operatórios estão calculados na Tabela 3.25 e na Tabela 3.26, para FAI e FAII respectivamente. Pela comparação das duas tabelas pode constatar-se que não houve diferenças significativas no desempenho das duas configurações. A Figura 3.42, que representa a variação da eficiência de remoção de CQO solúvel em função do tempo de retenção hidráulico para ambas as configurações evidencia esse facto.

Em FAII, entre os dias 764 e 862, a carga orgânica aplicada manteve-se constante, mas, a partir do dia 809, a alimentação passou de dupla a tripla (Figura 3.39 (a) e (b)). A eficiência de remoção aumentou de 84.8 para 87.1% com essa mudança do esquema de alimentação, mas em FAI a eficiência foi de 87.7%.

Para cargas orgânicas aplicadas entre 4 e 10 kg CQO/m³.dia, a carga orgânica removida variou linearmente com a carga orgânica aplicada em ambos os digestores (Figura 3.43), o que é típico em filtros anaeróbios (WEILAND E THOMSON, 1990, YOUNG, 1991).

Os teores de sólidos na corrente de saída foram elevados e muito oscilantes para ambos os digestores, especialmente a partir do tempo de retenção de 1 dia (Figura 3.44).

Relativamente à produção de biogás, verificou-se uma acentuada descida dos valores de produção de biogás em FAII, a partir do período iniciado no dia 862, devido a erros experimentais que se detectaram no final do operação. De facto, o separador de biogás do 2º andar de FAII tinha-se descolado e deixava passar o biogás para o 3º andar. O contador de gás do 3º andar não era adequado para medir os elevados caudais de biogás que então eram produzidos e detectaram-se muitas anomalias de funcionamento, conduzindo a valores errados.

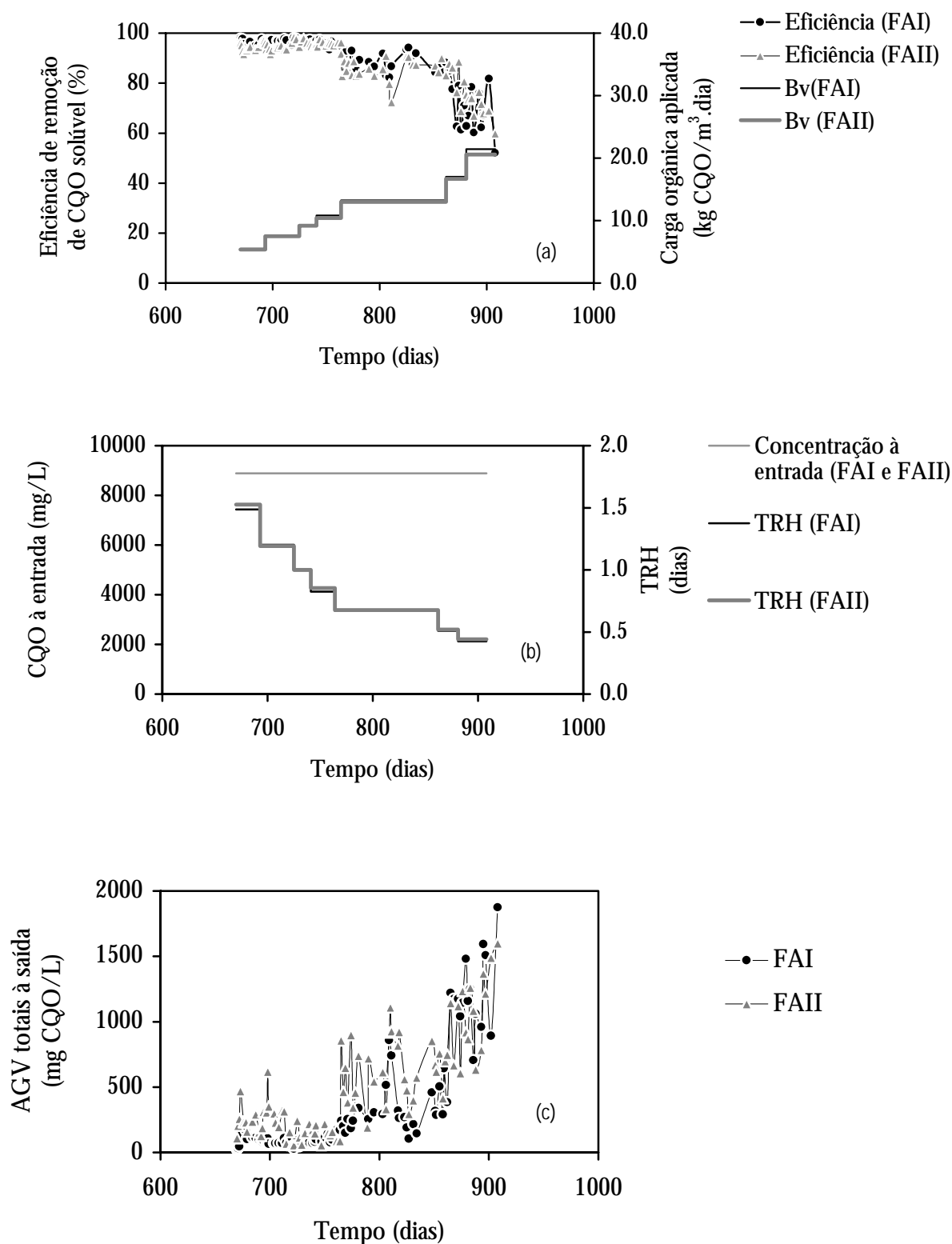


Figura 3.41 Dados operatórios e resultados de exploração do filtro anaeróbio não segmentado (FAI) e segmentado (FAII) durante a operação com concentração de substrato de 9 gCQO/L e tempo de retenção hidráulico decrescente entre 2 dias e 10 horas. Carga orgânica aplicada e eficiência de remoção (a), Concentração à entrada e tempo de retenção hidráulico (b) e ácidos voláteis à saída (c).

Tabela 3.25 Dados operatórios e resultados de exploração de FAI durante o período de operação com concentração de substrato de 9 g CQO/L e tempo de retenção decrescente entre 2 dias e 10 horas (\pm intervalo com 95% de confiança).

Tempo (dias)	TRH (dias)	CQO à entrada (mg/L)	Carga Orgânica Aplicada (kgCQO/m ³ .dia)	CQO solúvel à saída (mg/L)	CQO total à saída (mg/L)	Eficiência de remoção CQO solúvel (%)	CH ₄ (%)	biogás (m ³ /m ³ .dia)
[628-670]	1.93 (± 0.01)	8863 (± 142)	4.59 (± 0.08)	178 (± 52)	1654 (± 424)	98.0 (± 0.6)	62.0 (± 0.6)	2.7 (± 0.1)
[670-693]	1.49 (± 0.01)		5.95 (± 0.10)	313 (± 43)	1796 (± 249)	96.1 (± 0.7)	61.2 (± 1.2)	3.5 (± 0.1)
[693-725]	1.20 (± 0.01)		7.39 (± 0.13)	263 (± 76)	2469 (± 441)	97.2 (± 0.2)	59.3 (± 1.7)	4.2 (± 0.3)
[725-741]	1.00 (± 0.01)		8.86 (± 0.14)	397 (± 150)	5118 (± 2234)	95.7 (± 1.5)	56.7 (± 0.1)	4.1 (± 0.1)
[741-764]	0.82 (± 0.01)		10.81 (± 0.22)	454 (± 56)	2240 (± 367)	94.8 (± 0.8)	60.7 (± 1.2)	5.4 (± 0.2)
[764-862]	0.67 (± 0.01)		13.23 (± 0.21)	1097 (± 153)	6064 (± 1970)	87.7 (± 1.6)	60.2 (± 0.9)	6.2 (± 0.2)
[862-881]	0.51 (± 0.01)		17.38 (± 0.28)	2723 (± 373)	5343 (± 1461)	67.4 (± 5.9)	57.1 (± 1.4)	7.8 (± 0.3)
[881-908]	0.43 (± 0.01)		20.61 (± 0.58)	2840 (± 830)	6705 (± 898)	67.9 (± 9.1)	54.8 (± 0.8)	9.8 (± 0.2)

Tabela 3.26 Dados operatórios e resultados de exploração de FAII durante o período de operação com concentração de substrato de 9 g CQO/L e tempo de retenção decrescente entre 2 dias e 10 horas (\pm intervalo com 95% de confiança).

Tempo (dias)	TRH (dias)	CQO à entrada (mg/L)	Carga Orgânica Aplicada (kgCQO/m ³ .dia)	CQO solúvel à saída (mg/L)	CQO total à saída (mg/L)	Eficiência de remoção CQO solúvel (%)	CH ₄ (médio) (%)	biogás (médio) (m ³ /m ³ .dia)
[628-670]	2.05 (± 0.01)	8865 (± 143)	4.32 (± 0.07)	266 (± 75)	1386 (± 673)	97.0 (± 0.9)	60.6 (± 1.9)	2.7 (± 0.1)
[670-693] (*)	1.53 (± 0.02)		5.79 (± 0.12)	397 (± 69)	2464 (± 558)	95.1 (± 0.9)	59.9 (± 1.5)	3.2 (± 0.1)
[693-725] (*)	1.19 (± 0.01)		7.45 (± 0.14)	410 (± 124)	2420 (± 465)	95.5 (± 1.4)	58.3 (± 3.1)	3.6 (± 0.1)
[725-741] (*)	1.00 (± 0.01)		8.86 (± 0.14)	427 (± 37)	2446 (± 673)	95.3 (± 0.4)	56.4 (± 2.9)	5.0 (± 0.1)
[741-764] (*)	0.85 (± 0.01)		10.43 (± 0.21)	378 (± 59)	2869 (± 1610)	95.8 (± 0.4)	59.2 (± 2.9)	5.3 (± 0.2)
[764-809] (*)	0.68 (± 0.01)		13.04 (± 0.21)	1292 (± 199)	6823 (± 3061)	84.8 (± 2.7)	59.3 (± 2.8)	5.6 (± 0.2)
[809-862] (**)	0.68 (± 0.01)		13.04 (± 0.21)	1140 (± 158)	5891 (± 2866)	87.1 (± 1.8)	58.5 (± 3.3)	5.6 (± 0.2)
[862-881] (**)	0.52 (± 0.01)		17.05 (± 0.27)	1828 (± 401)	3734 (± 1042)	78.0 (± 5.6)	58.0 (± 18.0)	4.0 (***) (± 0.9)
[881-908] (**)	0.44 (± 0.01)		20.15 (± 0.56)	2739 (± 483)	5210 (± 475)	69.3 (± 4.8)	53.4 (± 6.8)	4.9 (***) (± 0.4)

(*) alimentação dupla (**) alimentação tripla

(***) Valores sujeitos a elevado erro experimental

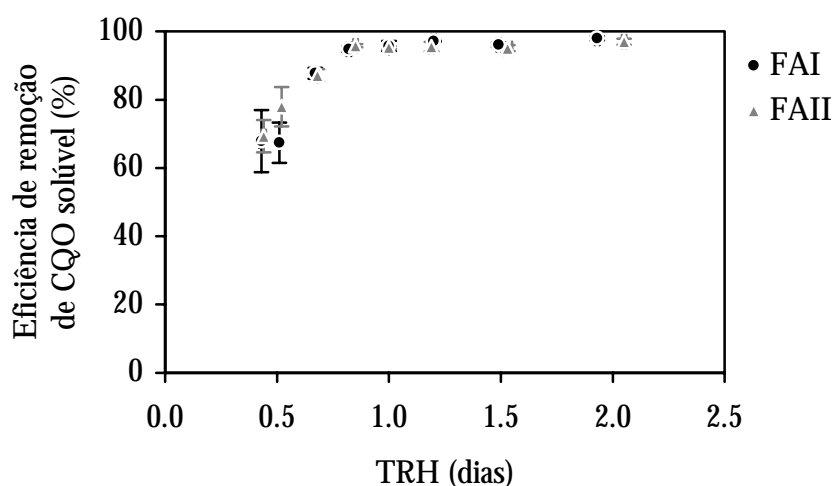


Figura 3.42 Variação da eficiência de remoção de CQO solúvel com o tempo de retenção hidráulico em FAI e FAII durante o período de operação com concentração de substrato de 9 g CQO/L e tempo de retenção hidráulico decrescente entre 2 dias e 10 horas.

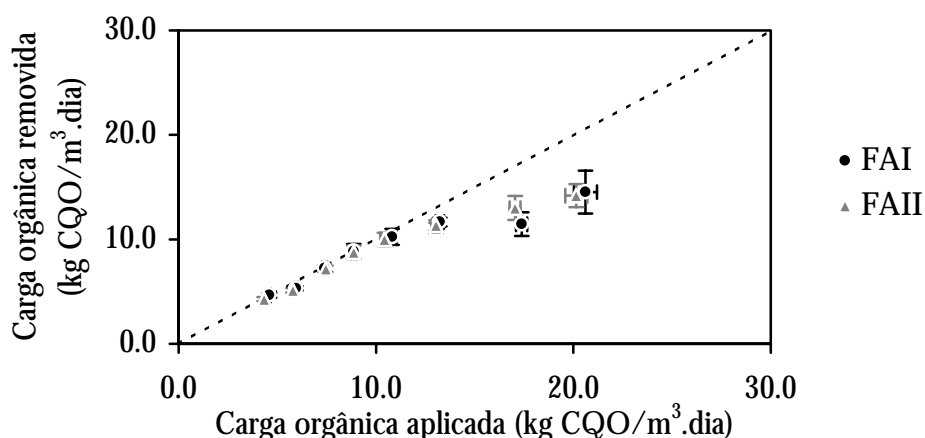


Figura 3.43 Variação da carga orgânica removida com a carga orgânica aplicada em FAI e FAII durante o período de operação com concentração de substrato de 9 g CQO/L e tempo de retenção decrescente entre 2 dias e 10 horas.

Pela análise dos dados experimentais pensa-se que este problema só ocorreu a partir do período iniciado no dia 862 de operação. Na Figura 3.45 estão representados os rendimentos em metano obtidos ao longo da operação em FAI e FAII. Pelas razões já referidas, em FAII os dois últimos pontos foram sujeitos a elevado erro experimental e em FAI, apesar de não se terem detectado falhas no contador de gás, o aumento do rendimento verificado nos dois últimos pontos também não é explicável.

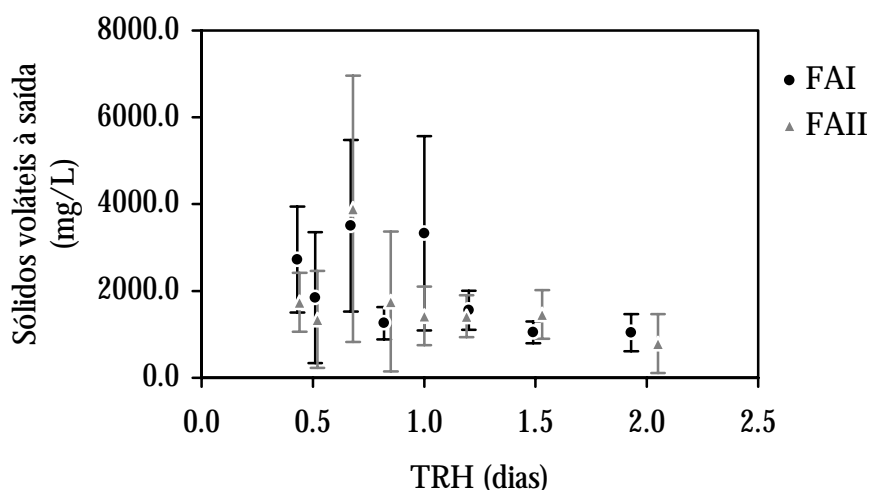


Figura 3.44 Variação dos teores de sólidos voláteis à saída de FAI e de FAII com o tempo de retenção hidráulica durante o período de operação com concentração de substrato de 9 g CQO/L e tempo de retenção hidráulica decrescente entre 2 dias e 10 horas.

Exceptuando os dois últimos pontos, em termos globais não se verificaram diferenças significativas entre os rendimentos obtidos em cada digestor.

Na Tabela 3.27 e na Tabela 3.28 estão registados os valores médios de AGV na corrente de saída de FAI e de FAII nestas condições operatórias, verificando-se que os teores de AGV em FAII foram superiores aos de FAI, com excepção dos valores para os tempos de retenção mais baixos. No entanto, as diferenças não foram muito significativas.

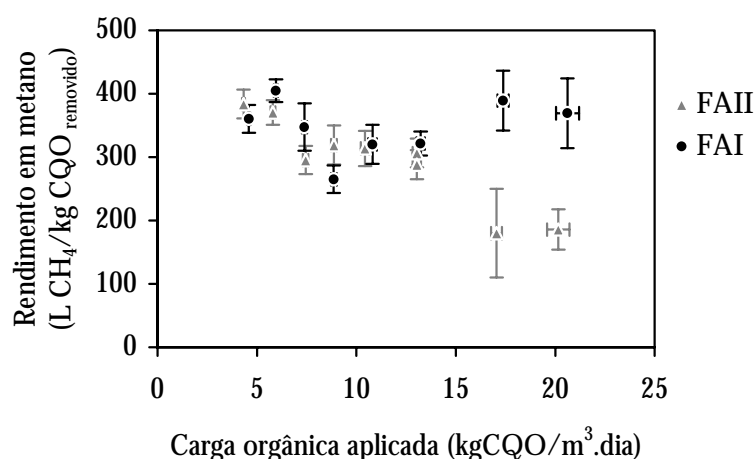


Figura 3.45 Comparação dos rendimentos médios em metano obtidos em FAI e em FAII durante o período de operação com concentração de substrato de 9 gCQO/L e tempo de retenção hidráulica decrescente entre 2 dias e 10 horas.

Tabela 3.27 Valores médios dos AGV obtidos à saída de FAI durante o período de operação com concentração de substrato constante e tempo de retenção hidráulico decrescente.

Tempo (dias)	Lactato (mg/L)	Formato (mg/L)	Acetato (mg/L)	Propionato (mg/L)	Butirato (mg/L)	AGV totais (mg CQO/L)
[628-670]	0	0	33.9±20.7	13.2±10.4	3.84±0.46	64.0±23.2
[670-693]	3.55±6.35	0	49.6±7.32	32.1±4.9	3.88±0.53	112.2±10.9
[693-725]	0	0	39.8±24.1	12.5±8.4	0	61.5±25.5
[725-741]	0	0	38.5±15.9	13.4±8.2	0	61.4±17.9
[741-764]	0	0	59.7±20.8	38.2±4.8	0	121.6±21.3
[764-862]	14.8±10.7	0	151.0±38.0	114.5±25.5	8.67±4.17	365.0±47.2
[862-881]	101.4±68.4	13.3±8.2	465.2±91.7	377.4±41.6	14.8±4.4	1200.6±122.1
[881-908]	354.6±219.1	45.6±25.8	481.0±92.4	310.0±26.7	7.57±4.39	1367.1±240.7

Tabela 3.28 Valores médios dos AGV obtidos à saída de FAII durante o período de operação com concentração de substrato constante e tempo de retenção hidráulico decrescente.

Tempo (dias)	Lactato (mg/L)	Formato (mg/L)	Acetato (mg/L)	Propionato (mg/L)	Butirato (mg/L)	AGV totais (mg CQO/L)
[628-670]	0	0	85.6±35.2	21.6±11.2	0	124.2±36.9
[670-693] (*)	0	0	86.3±19.6	63.6±16.6	4.55±1.02	196.7±25.7
[693-725] (*)	0	0	45.5±26.0	40.0±25.2	0	109.1±36.2
[725-741] (*)	0	0	67.6±10.7	74.0±14.9	0	184.0±18.4
[741-764] (*)	0	0	52.1±15.8	50.5±13.3	0	132.1±20.6
[764-809] (*)	0	0	223.0±67.3	217.0±69.2	6.36±3.65	577.9±96.6
[809-862] (**)	0	0	237.8±43.2	220.7±43.5	8.23±3.65	602.6±61.4
[862-881] (**)	4.12±7.23	0	360.0±68.5	348.0±76.6	19.04±6.15	949.4±103.2
[881-908] (**)	38.0±38.8	13.7±10.2	549.8±113.1	410.2±109.2	23.4±6.67	1293.2±166.2

(*) alimentação dupla

(**) alimentação tripla

Em FAII, quando a alimentação passou de dupla a tripla, os valores de AGV aumentaram, mas não significativamente. Com os aumentos posteriores de caudal, por aumento de todas as correntes alimentadas, os AGV à saída aumentaram menos neste digestor do que na configuração não segmentada tradicional. Essas diferenças são devidas essencialmente aos níveis de ácido láctico que aumentaram significativamente à saída de FAI para o último período de operação registrado na Tabela 3.27.

3.4.4.3 Comportamento de cada andar de FAII

Na Figura 3.46, na Figura 3.47 e na Figura 3.48, estão representados os valores evolutivos da carga orgânica aplicada (Bv), da eficiência de remoção, do tempo de retenção hidráulico (TRH), da concentração de substrato à entrada e dos teores de Ácidos Gordos Voláteis (AGV) nas correntes de saída do 1º, 2º e 3º andares de FAII, respectivamente.

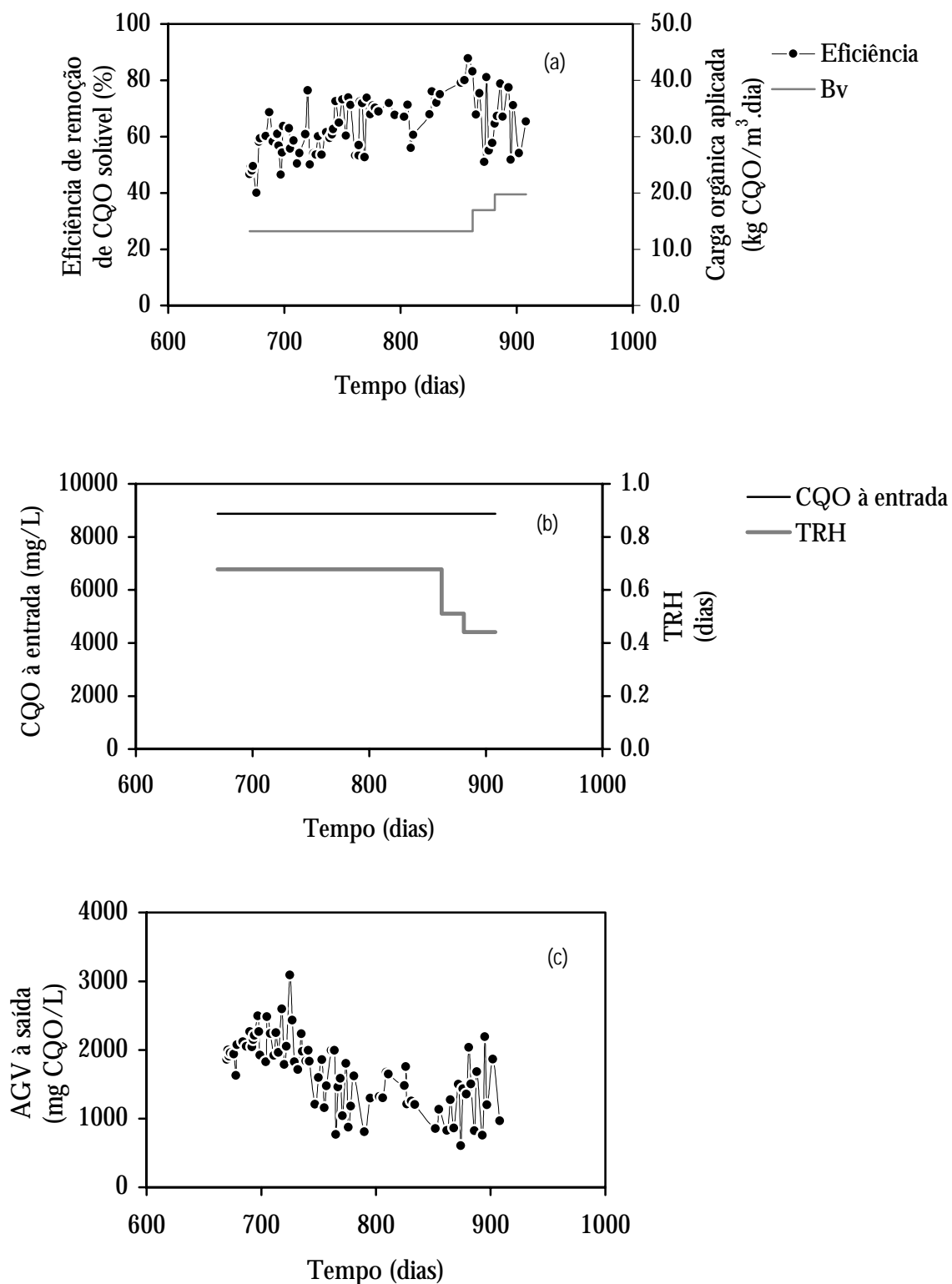


Figura 3.46 Dados operatórios e resultados de exploração do 1º andar do filtro anaeróbio segmentado (FAII) durante o período de operação com concentração de substrato de 9 g CQO/L e tempo de retenção decrescente entre 2 dias e 10 horas, com alimentação repartida. Carga orgânica aplicada e eficiência de remoção (a), concentração à entrada e tempo de retenção hidráulico (b) e ácidos voláteis à saída (c).

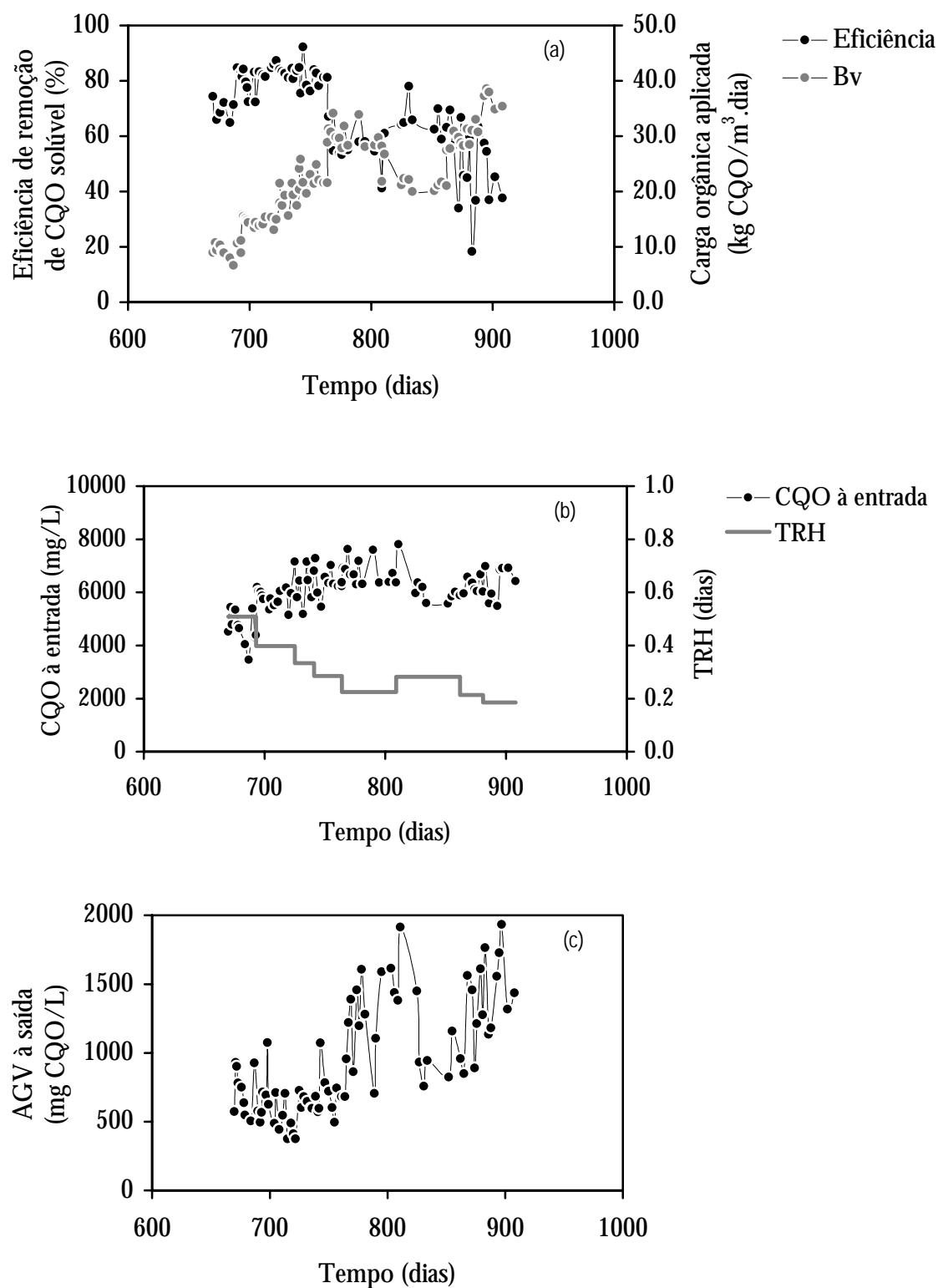


Figura 3.47 Dados operatórios e resultados de exploração do 2º andar do filtro anaeróbico segmentado (FAII) durante o período de operação com concentração de substrato de 9 g CQO/L e tempo de retenção decrescente entre 2 dias e 10 horas, com alimentação repartida. Carga orgânica aplicada e eficiência de remoção (a), concentração à entrada e tempo de retenção hidráulico (b) e ácidos voláteis à saída (c).

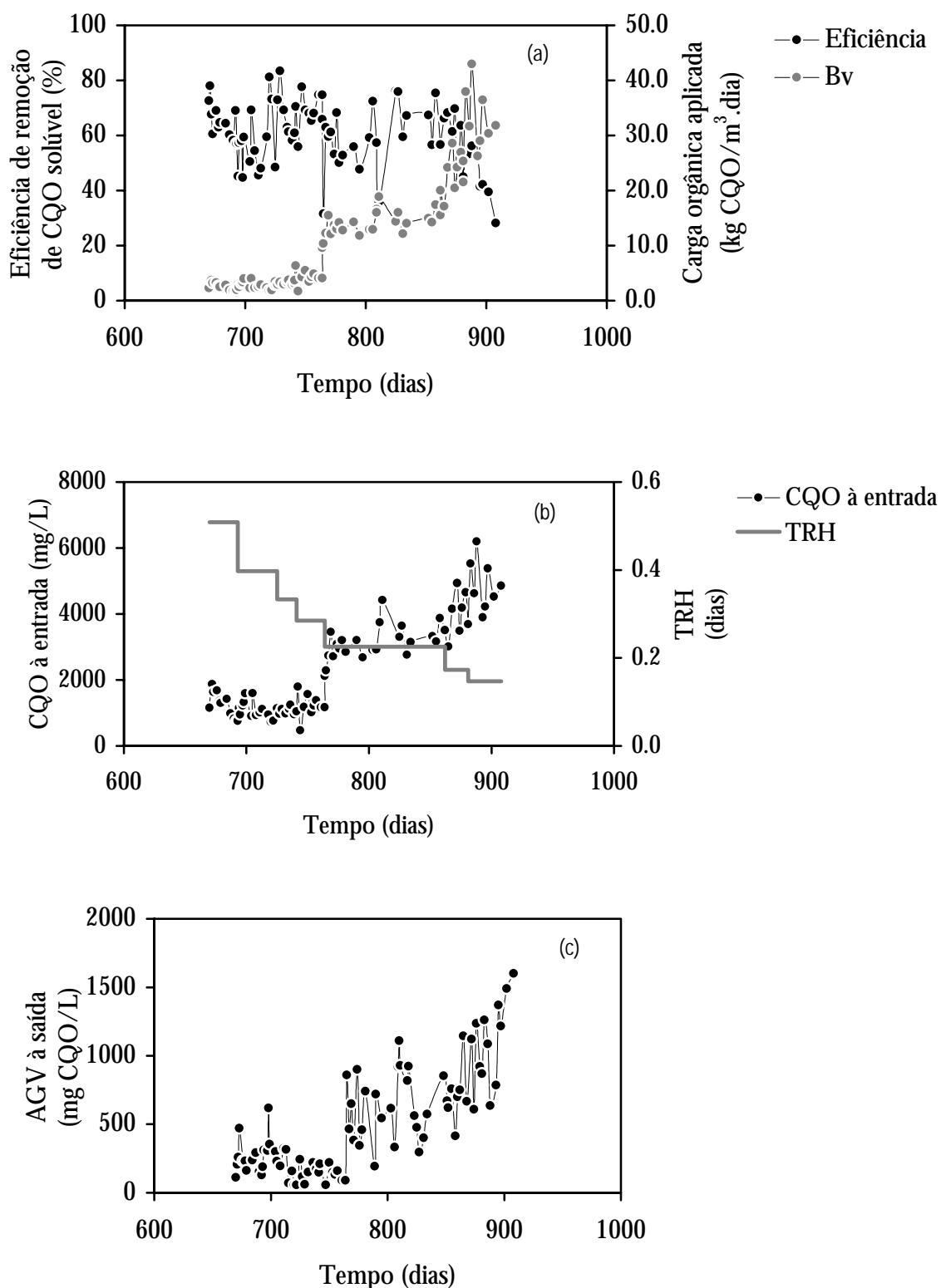


Figura 3.48 Dados operatórios e resultados de exploração do 3º andar do filtro anaeróbio segmentado (FAII) durante o período de operação com concentração de substrato de 9 g CQO/L e tempo de retenção decrescente entre 2 dias e 10 horas, com alimentação repartida. Carga orgânica aplicada e eficiência de remoção (a), concentração à entrada e tempo de retenção hidráulico (b) e ácidos voláteis à saída (c).

Na Tabela 3.29, na Tabela 3.30 e na Tabela 3.31 estão representados os valores médios destes parâmetros para cada andar.

Tabela 3.29 Dados operatórios e resultados de exploração do 1º andar do filtro anaeróbio segmentado (FAII) durante o período de operação com concentração de substrato de 9 g CQO/L e tempo de retenção decrescente entre 2 dias e 10 horas, com alimentação repartida (\pm intervalo com 95% de confiança).

Tempo (dias)	TRH (dias)	CQO à entrada (mg/L)	Carga Orgânica Aplicada (kgCQO/m³.dia)	CQO solúvel à saída (mg/L)	Eficiência de remoção CQO solúvel (%)	CH ₄ (%)	biogás (m³/m³.dia)
[628-862]	0.68 (± 0.01)	8865 (± 143)	13.1 (± 0.2)	3400 (± 199)	61.3 (± 2.3)	54.4 (± 0.9)	4.0 (± 0.1)
[862-881]	0.52 (± 0.01)	↓	17.40 (± 0.3)	3176 (± 690)	61.9 (± 9.2)	57.9 (± 0.8)	4.8 (± 0.6)
[881-908]	0.44 (± 0.01)		20.2 (± 0.6)	3182 (± 776)	64.0 (± 8.6)	53.6 (± 5.2)	4.7 (± 0.7)

Tabela 3.30 Dados operatórios e resultados de exploração do 2º andar do filtro anaeróbio segmentado (FAII) durante o período de operação com concentração de substrato de 9 g CQO/L e tempo de retenção decrescente entre 2 dias e 10 horas, com alimentação repartida (\pm intervalo com 95% de confiança).

Tempo (dias)	TRH (dias)	CQO à entrada (mg/L)	Carga Orgânica Aplicada (kgCQO/m³.dia)	CQO solúvel à saída (mg/L)	Eficiência de remoção CQO solúvel (%)	CH ₄ (%)	biogás (m³/m³.dia)
[628-670]	0.68 (± 0.01)	4455.1 (± 315)	6.55 (± 0.46)	996 (± 195)	77.5 (± 4.4)	65.8 (± 1.0)	3.1 (± 0.1)
[670-693]	0.51 (± 0.01)	4710 (± 337)	9.23 (± 0.68)	1060 (± 199)	75.6 (± 5.1)	62.7 (± 1.4)	4.4 (± 0.1)
[693-725]	0.40 (± 0.01)	5729 (± 294)	14.50 (± 0.74)	947 (± 110)	84.1 (± 1.4)	60.0 (± 2.3)	5.8 (± 0.3)
[725-741]	0.33 (± 0.01)	6351 (± 457)	19.25 (± 1.39)	1091 (± 105)	83.3 (± 1.6)	55.8 (± 1.3)	8.7 (± 0.5)
[741-764]	0.28 (± 0.01)	6424 (± 310)	22.94 (± 1.11)	1256 (± 140)	80.5 (± 2.1)	59.1 (± 0.9)	8.5 (± 0.5)
[764-809]	0.22 (± 0.01)	6740 (± 229)	30.64 (± 1.04)	3049 (± 277)	53.8 (± 4.7)	56.6 (± 2.6)	5.9 (± 0.1)
[809-862]	0.28 (± 0.01)	6159 (± 376)	22.00 (± 1.34)	2003 (± 249)	66.1 (± 4.3)	57.3 (± 1.3)	5.1 (± 0.2)
[862-881]	0.21 (± 0.01)	6244 (± 220)	29.74 (± 1.05)	3136 (± 688)	50.0 (± 10.0)	56.6 (± 0.7)	4.1 (± 0.1)
[881-908]	0.18 (± 0.01)	6517 (± 484)	36.20 (± 3.36)	3604 (± 476)	46.3 (± 7.4)	53.5 (± 1.8)	7.6 (± 0.4)

Tabela 3.31 Dados operatórios e resultados de exploração do 3º andar do filtro anaeróbio segmentado (FAII) durante o período de operação com concentração de substrato de 9 g CQO/L e tempo de retenção decrescente entre 2 dias e 10 horas, com alimentação repartida (\pm intervalo com 95% de confiança).

Tempo (dias)	TRH (dias)	CQO à entrada (mg/L)	Carga Orgânica Aplicada (kgCQO/m ³ .dia)	CQO solúvel à saída (mg/L)	Eficiência de remoção CQO solúvel (%)	CH ₄ (%)	biogás (m ³ /m ³ .dia)
[628-670]	0.68 (± 0.01)	996 (± 195)	1.46 (± 0.29)	266 (± 75)	73.4 (± 5.9)	69.5 (± 0.9)	1.0 (± 0.1)
[670-693]	0.51 (± 0.01)	1060 (± 199)	2.08 (± 0.39)	397 (± 69)	62.3 (± 2.9)	68.3 (± 1.0)	1.1 (± 0.2)
[693-725]	0.40 (± 0.01)	947 (± 110)	2.37 (± 0.27)	410 (± 124)	58.6 (± 9.4)	63.5 (± 2.6)	1.1 (± 0.1)
[725-741]	0.33 (± 0.01)	1091 (± 105)	3.31 (± 0.32)	427 (± 37)	60.8 (± 1.6)	62.2 (± 0.5)	2.2 (± 0.1)
[741-764]	0.28 (± 0.01)	1256 (± 140)	4.49 (± 0.50)	378 (± 59)	70.0 (± 2.8)	65.2 (± 0.6)	3.4 (± 0.2)
[764-809]	0.22 (± 0.01)	3049 (± 277)	13.26 (± 1.21)	1292 (± 199)	57.5 (± 6.1)	64.2 (± 2.3)	7.2 (± 0.5)
[809-862]	0.22 (± 0.01)	3347 (± 253)	14.55 (± 1.10)	1140 (± 158)	65.4 (± 5.7)	61.5 (± 1.5)	7.7 (± 0.6)
[862-881]	0.17 (± 0.01)	4191 (± 485)	24.65 (± 2.85)	1828 (± 401)	56.2 (± 9.6)	60.1 (± 2.9)	3.2 (± 2.5)
[881-908]	0.15 (± 0.01)	4577 (± 451)	30.51 (± 3.01)	2739 (± 483)	40.6 (± 6.6)	52.8 (± 3.7)	2.5 (± 1.0)

Durante este período operatório as condições aplicadas no primeiro andar mantiveram-se constantes até ao dia 862. A carga média aplicada foi de 13 kg CQO/m³.dia e a eficiência de remoção média foi de 61% embora tenha mostrado uma tendência crescente ao longo do tempo. No **sub-Capítulo 3.4.4.5**, página **195**, em que se caracterizam as actividades metanogénicas nos digestores neste período operatório, será discutido o valor da actividade metanogénica acetoclástica que, entre os dias 596 e 881, aumentou cerca de 10 vezes, sem que se tivessem alterado as condições operatórias neste andar.

O segundo andar operou durante este período com um substrato constituído por uma mistura de substrato parcialmente degradado e substrato não degradado. Verificou-se que este andar teve uma elevada capacidade de remoção de carga orgânica, sendo capaz de remover 80% de CQO solúvel com uma carga orgânica aplicada de 23 kg CQO/m³.dia (Tabela 3.30). Na Figura 3.49 está representada a comparação das capacidades de remoção dos três andares nestas condições operatórias. Verifica-se que o 2º andar remove cerca de

20% mais do que o 1º e o 2º andares, para cargas orgânicas aplicadas até 23 kg CQO/m³.dia. Comparando a Figura 3.49 com a Figura 3.43, pode constatar-se que o 2º andar apresentou maior capacidade de remoção de CQO do que FAI e FAII em termos globais.

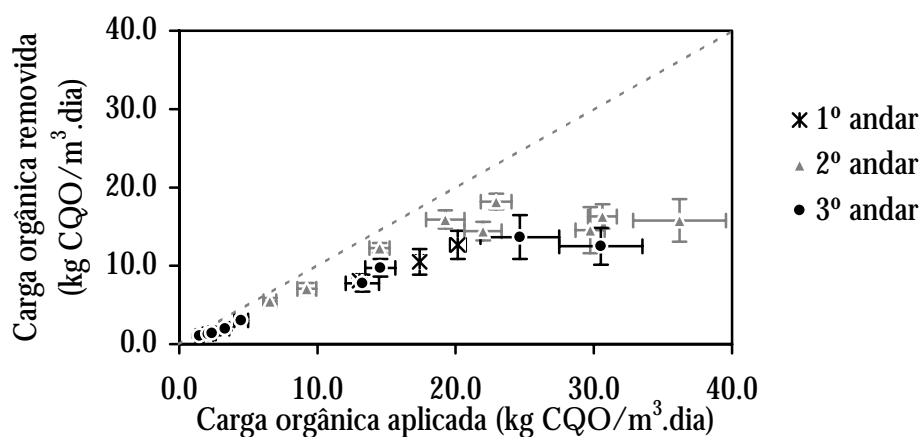


Figura 3.49 Variação da carga orgânica removida com a carga orgânica aplicada em cada andar de FAII durante o período de operação com concentração de 9 g CQO/L constante e tempo de retenção decrescente entre 2 dias e 10 horas.

Uma vez que o 2º andar apresentava uma elevada capacidade de degradação, pensou-se que o conjunto do 1º e do 2º andares deveria ser comparado com a configuração tradicional FAI (Figura 3.50).

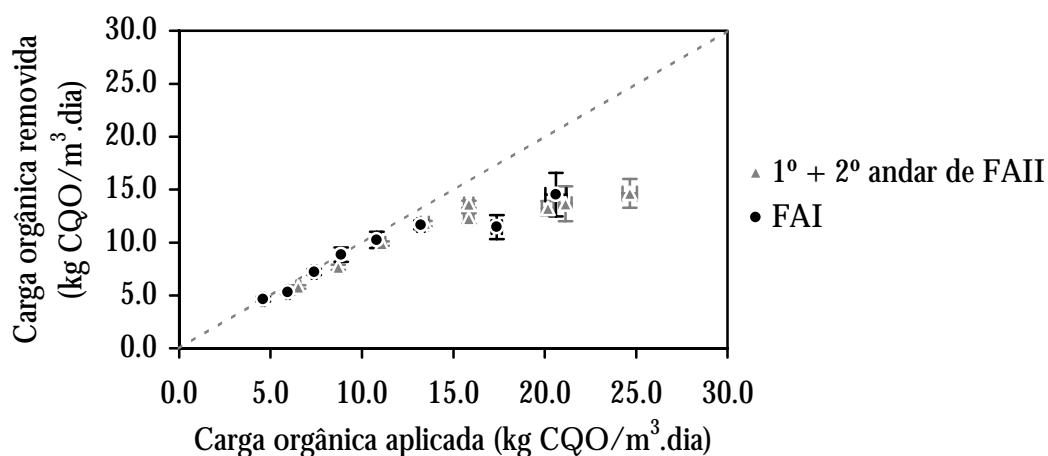


Figura 3.50 Variação da carga orgânica removida com a carga orgânica aplicada no conjunto do 1º e 2º andares de FAII durante o período de operação com concentração de substrato de 9 g CQO/L e tempo de retenção decrescente entre 2 dias e 10 horas. Comparação com a configuração convencional.

A capacidade de remoção atingiu o limite máximo a partir de uma carga aplicada de 16 kg CQO/m³.dia e não se verificaram diferenças significativas entre FAI e o conjunto do 1º e do 2º andares de FAII.

3.4.4.4 Variação do pH e da razão CQO/N

Como foi referido no **sub-Capítulo 3.4.4.1**, página 175 a opção de adicionar alimentações laterais em FAII foi justificada pelos valores de pH no 1º andar e pelas baixas razões CQO/N que eram aplicadas no 2º e 3º andares. Na Figura 3.51 está representada a variação ao longo do tempo, do pH à saída de cada andar durante este período operatório.

Com o esquema de alimentação distribuída que se aplicou, o pH manteve-se estável no primeiro andar variando em torno dum valor médio de 6.78, tendo só pontualmente atingido valores de 6.6. No 2º e 3º andares o pH teve uma tendência decrescente ao longo do tempo, mas nunca foram atingidos valores inferiores a 6.68 no 2º andar e a 6.91 no 3º andar (Figura 3.51).

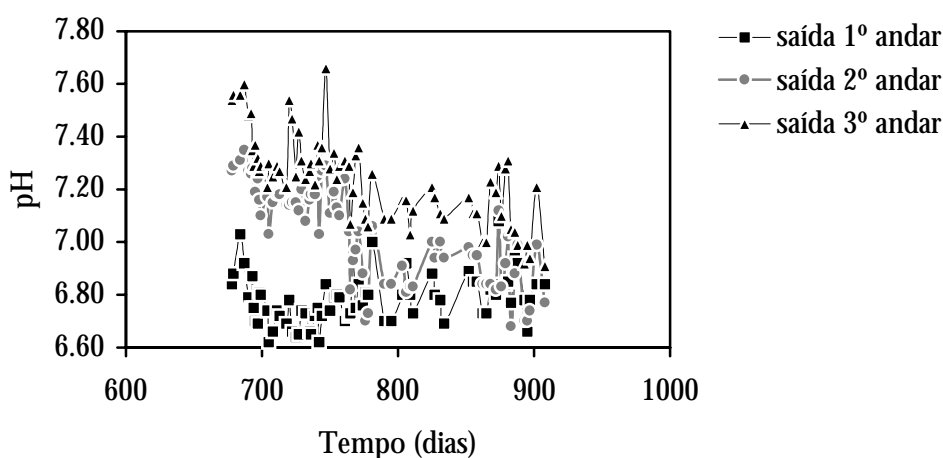


Figura 3.51 Variação ao longo do tempo do pH à saída de cada andar durante o período operatório com concentração de substrato constante e tempo de retenção decrescente.

Verificou-se também que, com a distribuição da alimentação, a razão CQO/N aumentou à entrada de cada andar. Na Tabela 3.32 estão registados os valores da razão CQO/N à entrada do 2º e 3º andares nas situações de alimentação única na base do digestor, alimentação dupla e alimentação tripla. Os valores de azoto total e CQO à entrada de cada

andar foram calculados por balanço material, tendo em conta o azoto que saía do andar anterior e o azoto que era introduzido na corrente de substrato adicionada lateralmente. Este balanço está esquematizado na Figura 3.52.

Tabela 3.32 Variação da razão CQO/N à entrada do 2º e do 3º andares nas situações de alimentação única, dupla e tripla.

CQO/N (mg CQO/mgN-NH ₄)	2º andar	3º andar
alimentação única (*)	9.7	1.2
alimentação dupla (**)	17.7	9.1
alimentação tripla (***)	17.0	9.2

(*) Tempo de retenção de 2 dias e concentração à entrada de 9000 mg CQO/L. (**) Tempo de retenção global de 16 horas, concentração de substrato constante e igual a 9000 mg CQO/L e máximo caudal alimentado à entrada do 2º andar (Figura 3.52 (a)). (***) Tempo de retenção global de 16 horas, concentração de substrato constante e igual a 9000 mg CQO/L e caudal distribuído pelos três andares (Figura 3.52 (b)).

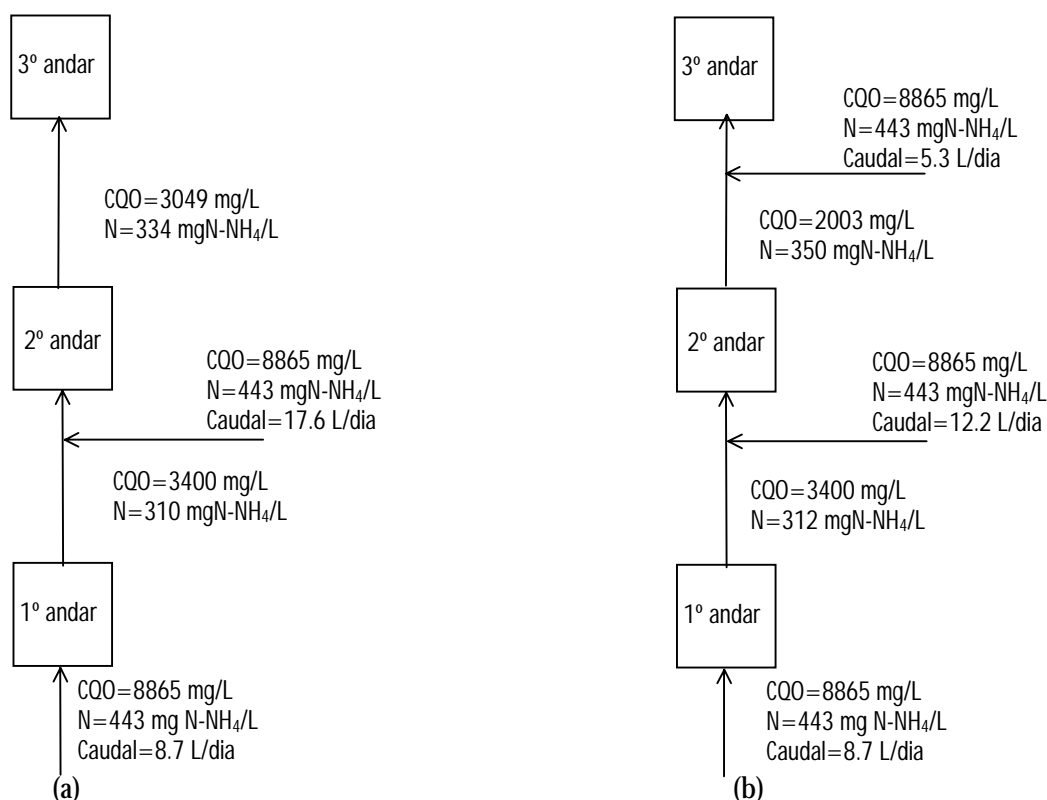


Figura 3.52 Balanços ao azoto e CQO para cálculo das razões CQO/N à entrada de cada andar na situação de alimentação dupla (a) e alimentação tripla (b).

A razão CQO/N aumentou com as adições laterais, o que era esperado. No entanto, se se tivesse testado uma alimentação única nas mesmas condições operatórias das situações de alimentação repartida (TRH=16 horas), a razão CQO/N deveria ser superior à obtida para TRH de 2 dias, não se sabendo, no entanto se seria ou não superior à obtida com alimentação distribuída. Por outro lado, não se comprovou que o aumento da razão CQO/N tenha sido benéfico para o funcionamento de cada andar, uma vez que o tempo de retenção hidráulico diminuiu concomitantemente, sendo o seu efeito provavelmente muito mais decisivo no funcionamento dos digestores. Ainda em termos da razão CQO/N, não foram detectadas diferenças entre estes valores para a situação de alimentação dupla e para a situação de alimentação tripla.

Em termos globais verificou-se que ambas as configurações se comportaram de modo muito semelhante nestas condições operatórias. A elevada capacidade de remoção do segundo andar até cargas orgânicas aplicadas de 23 kg CQO/m³.dia justificou a alimentação, neste andar, da maior parte de carga orgânica aplicada no digestor. Apesar do 2º andar ser muito eficiente e de apresentar uma capacidade remoção elevada não se comprovaram vantagens de um eventual sistema em duas fases com alimentação intermédia relativamente ao sistema tradicional. Além disso, este resultado foi pontual, não sendo possível fazer extrapolações para outros substratos ou concentrações.

3.4.4.5 Caracterização biológica da biomassa - actividades metanogénicas

Durante a operação com concentração de substrato de 9000 mg CQO/L e tempo de retenção hidráulico de 16 horas foram determinadas as actividades metanogénicas em acetato, H₂/CO₂, lactose, propionato e butirato. Em FAII caracterizou-se a situação de alimentação dupla e de alimentação tripla (tal como representadas no esquema da Figura 3.52 (a) e (b), respectivamente).

A actividade acetoclástica está representada na Figura 3.53 para FAI e FAII. Verificou-se que em FAII, em qualquer das situações, a actividade acetoclástica foi superior à medida em FAI. A alteração de alimentação dupla para alimentação tripla induziu uma diminuição da actividade acetoclástica no 2º e 3º andares, tendo-se considerado constante a actividade no 1º andar, dado que este andar não sofreu alterações. No entanto, é de salientar que a

actividade acetoclástica aumentou cerca de 10 vezes entre o dia 596 (Figura 3.22), e o dia 862, tendo-se aplicado neste andar condições operatórias constantes (com excepção do período entre os dias 596 e 628, em que se aumentou temporariamente a concentração à entrada).

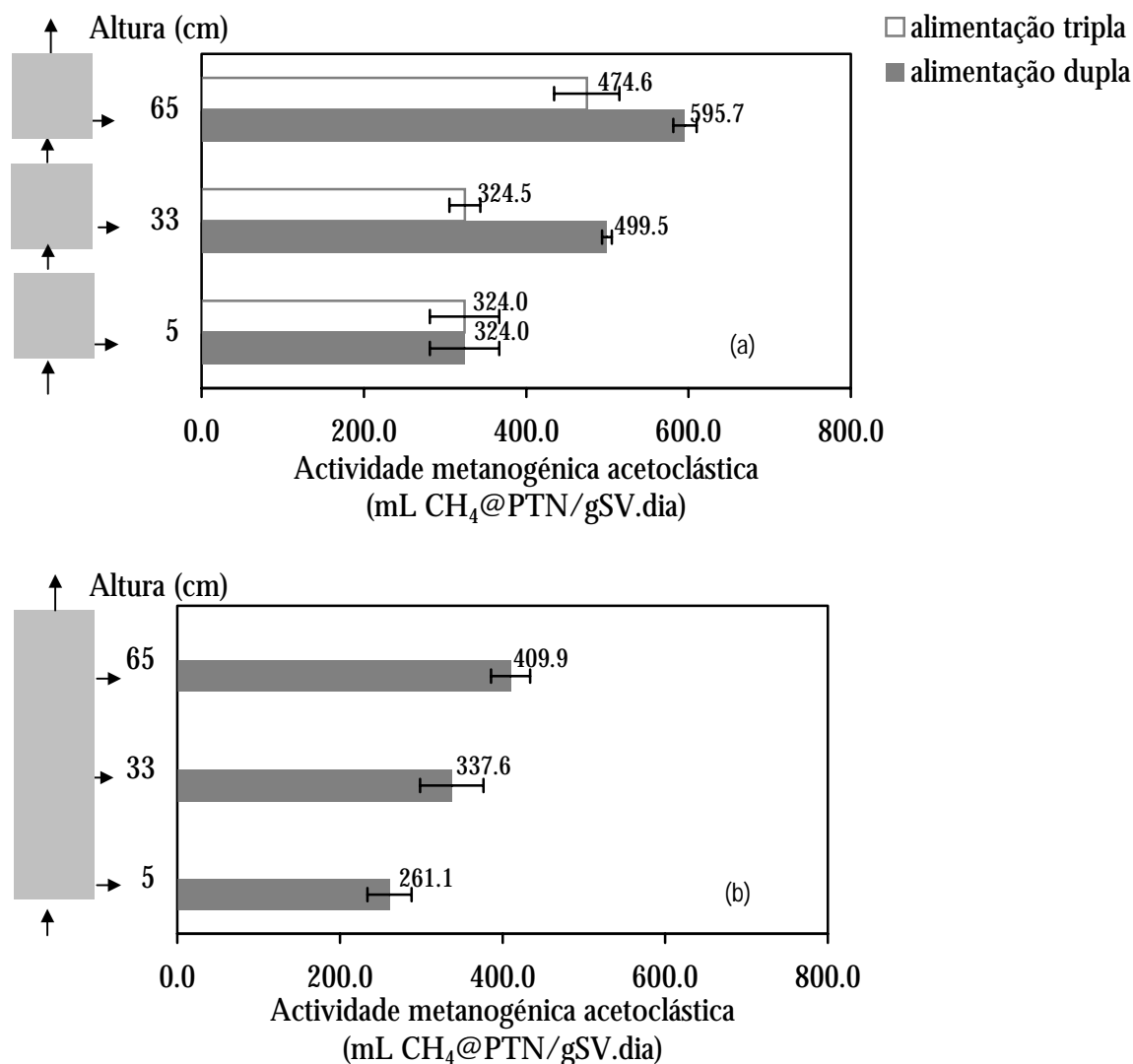


Figura 3.53 Distribuição da actividade metanogénica acetoclástica em FAII na situação de alimentação dupla e tripla (a) e em FAI (b) para a operação com tempo de retenção de 16 horas e concentração à entrada de 9000 mg CQO/L.

Comparando os dados da actividade acetoclástica nestas condições operatórias com os anteriormente obtidos (Figura 3.22), conclui-se que houve um aumento significativo desta actividade em todas as secções de ambos os digestores, incluindo na base.

Mesmo na situação de alimentação distribuída, continuou a verificar-se uma estratificação da actividade acetoclástica ao longo de FAII, embora mais evidente para a alimentação dupla. Em FAI, também se verificou um aumento significativo da actividade da base para o topo do digestor.

Relativamente à actividade metanogénica hidrogenofílica, verificou-se uma homogeneização dos valores ao longo da altura dos digestores (Figura 3.54).

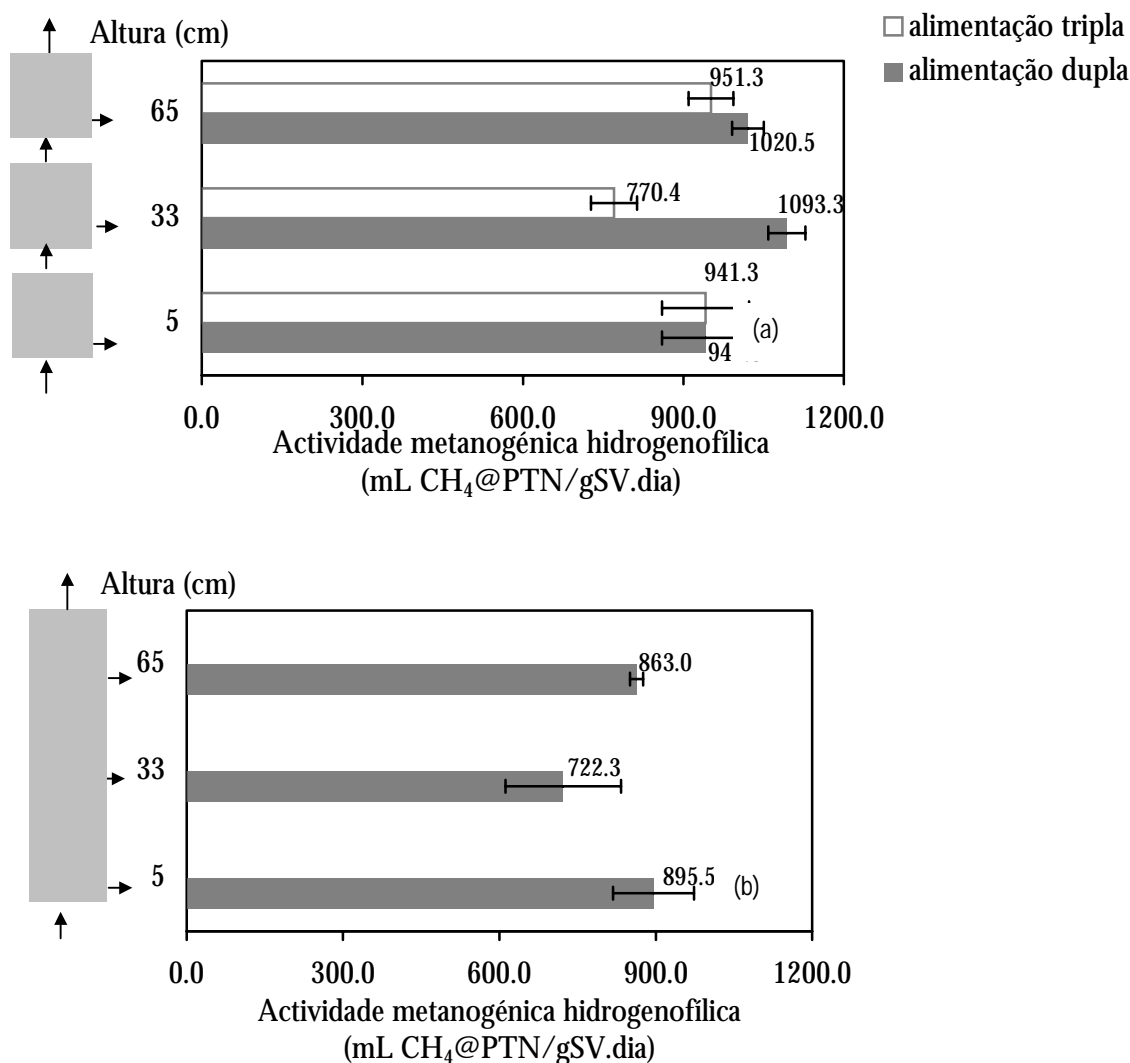


Figura 3.54 Distribuição da actividade metanogénica hidrogenofílica em FAII na situação de alimentação dupla e tripla (a) e em FAI (b) para a operação com tempo de retenção de 16 horas e concentração à entrada de 9000 mg CQO/L.

Em FAII registaram-se sempre actividades hidrogenofílicas superiores às registadas em FAI, embora as diferenças não sejam muito relevantes. Quando se alterou a alimentação

dupla para alimentação tripla, a actividade hidrogenofílica baixou significativamente no 2º andar. Os valores da actividade metanogénica hidrogenofílica são da mesma ordem de grandeza dos que haviam sido medidos anteriormente para TRH de 2 dias.

Em FAI a actividade em lactose foi máxima na base do digestor, mas em FAII o máximo de actividade acidogénica foi registado no 2º andar (Figura 3.55). Com a alteração de alimentação dupla para alimentação tripla a actividade no 3º andar aumentou.

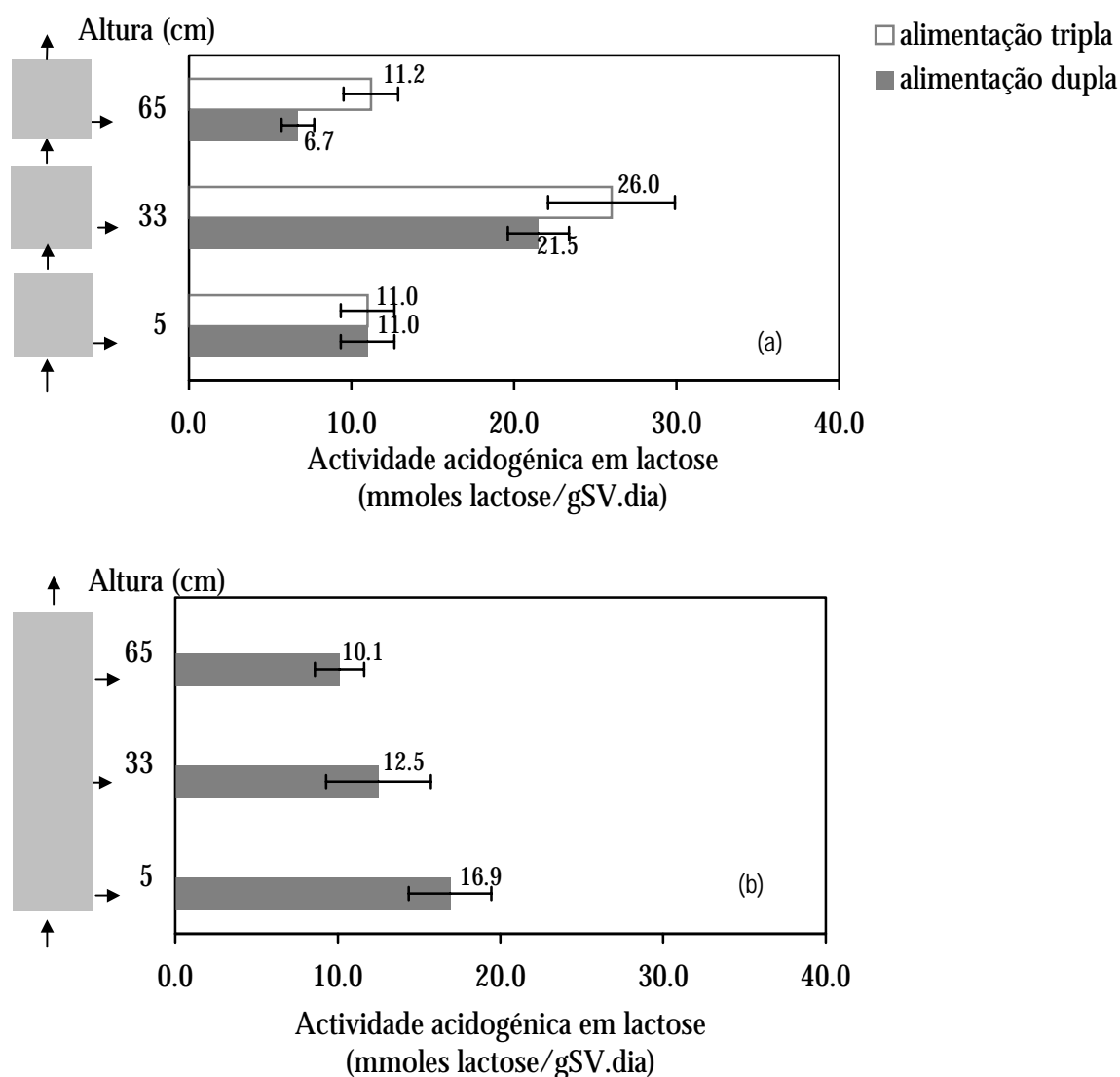


Figura 3.55 Distribuição da actividade acidogénica em lactose em FAII na situação de alimentação dupla e tripla (a) e em FAI (b) para a operação com tempo de retenção de 16 horas e concentração à entrada de 9000 mg CQO/L.

No 2º andar também se registou um aumento que não era esperado, mas que, atendendo aos intervalos de confiança associados (95%) não foi significativo. Comparando a actividade acidogénica em lactose nestas situações com a que havia sido medida para TRH de 2 dias (Figura 3.24), verifica-se que no 1º andar de FAII a actividade se manteve constante e que em FAI aumentou, em média, cerca de 22%, sendo o aumento na base bastante significativo (46%).

A actividade em substratos indirectos (propionato e butirato) está representada na Figura 3.56 e na Figura 3.57.

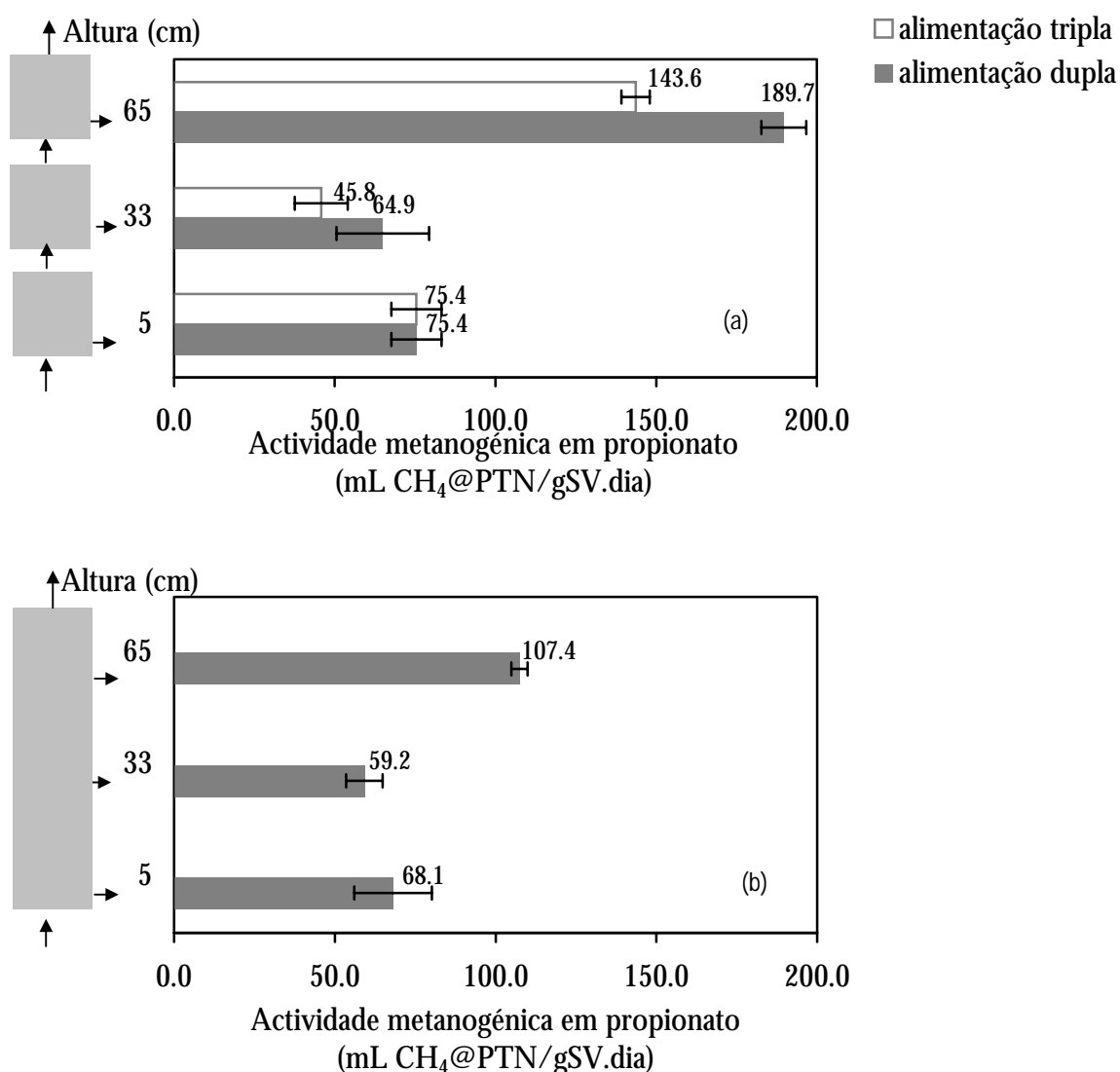


Figura 3.56 Distribuição da actividade metanogénica em propionato em FAII na situação de alimentação dupla e tripla (a) e em FAI (b) para a operação com tempo de retenção de 16 horas e concentração à entrada de 9000 mg CQO/L.

É interessante verificar que o máximo da actividade em propionato se deslocou do meio, para o topo de ambos os digestores, o que está de acordo com o observado por VAN LIER *et al.* (1996), num digestor segmentado termofílico. Com a alteração da alimentação dupla para alimentação tripla, a actividade em propionato baixou no 2º e 3º andares. O mínimo de actividade em propionato foi registado no 2º andar de FAII e na secção do meio de FAI. O mesmo se passou com a actividade em butirato para ambos os digestores (Figura 3.57). A actividade metanogénica em butirato aumentou, relativamente à que foi medida para TRH de 2 dias.

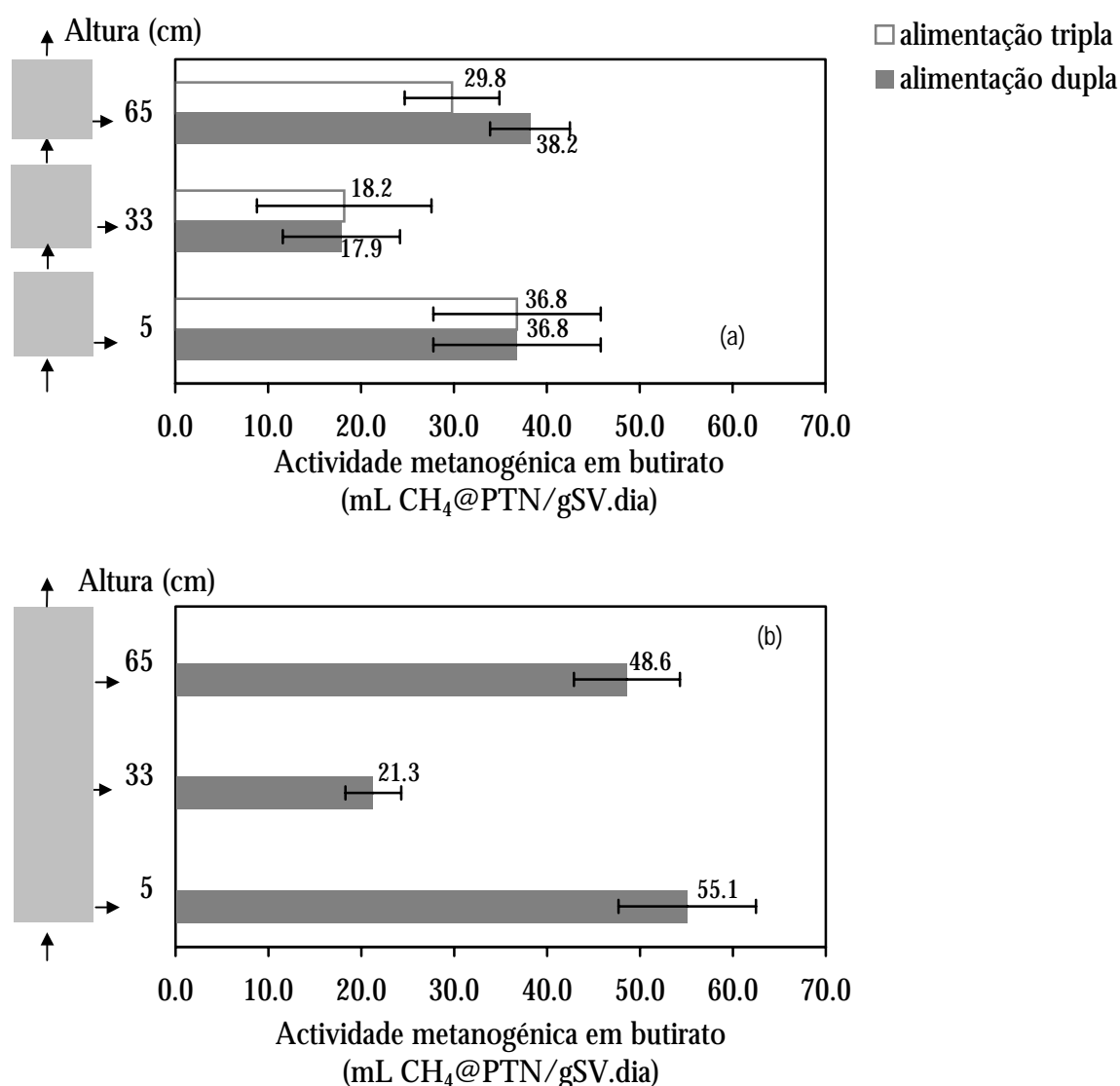


Figura 3.57 Distribuição da actividade metanogénica em butirato em FAII na situação de alimentação dupla e tripla (a) e em FAI (b) para a operação com tempo de retenção de 16 horas e concentração à entrada de 9000 mg CQO/L.

3.4.4.6 Caracterização física dos agregados - tamanho, velocidade de sedimentação e rugosidade

Nas mesmas amostras de biomassa em que se determinaram actividades metanogénicas mediu-se o tamanho (Figura 3.58), a velocidade de sedimentação (Figura 3.59) e a rugosidade da superfície dos agregados microbianos (Figura 3.61). Verificou-se que nas secções superiores dos digestores todos estes parâmetros aumentaram significativamente em ambos os digestores.

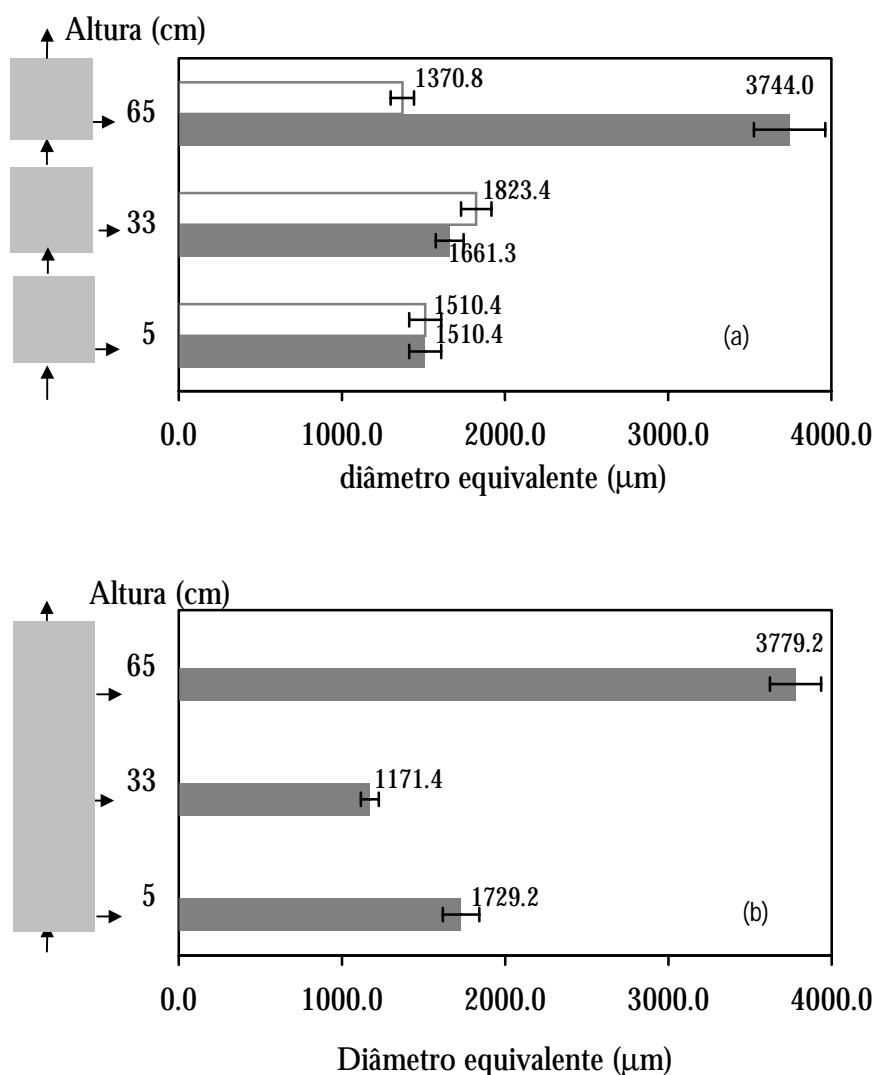


Figura 3.58 Distribuição do tamanho dos agregados em FAII na situação de alimentação dupla e tripla (a) e em FAI (b) para a operação com tempo de retenção de 16 horas e concentração à entrada de 9000 mg CQO/L.

Quando se alterou o esquema da alimentação em FAII, verificou-se uma diminuição acentuada do tamanho dos agregados do 3º andar, para menos de metade do valor que então possuíam (3.7 mm). Este era também o tamanho médio dos agregados que se estabeleceram na secção de topo do digestor não segmentado (FAI), para as mesmas condições operatórias. Nas outras secções dos digestores o tamanho dos agregados foi substancialmente inferior.

Nesta fase da operação observou-se um aumento acentuado do “*washout*”. Em FAII, a concentração de CQO total à saída foi de 6.8 e 5.9 g/L na situação de alimentação dupla e tripla, respectivamente e em FAI foi de 5.7 g/L. Estes valores representam aumentos médios de 150% relativamente às condições operatórias anteriores.

Ao contrário do que à partida se esperava, o aumento do tamanho dos agregados não evitou que houvesse menor retenção de biomassa e maior “*washout*”. De facto, o aumento do tamanho dos agregados pode ter sido devido à acumulação de biogás no seu interior, tornando as partículas menos densas. No caso presente, observando os valores da velocidade de sedimentação, conclui-se que esta era elevada no topo de ambos os digestores. No entanto, apesar do tamanho das partículas do 3º andar ter diminuído para metade quando se alterou o esquema da alimentação de dupla para tripla, a velocidade de sedimentação aumentou, sugerindo que as partículas se tornaram mais pequenas mas bastante mais densas (Figura 3.59). Uma possível explicação para este facto é a libertação do biogás acumulado, acompanhada de desintegração dos agregados, tal como sugerido por YODA E NISHIMURA (1997) para biomassa granular, em determinadas condições operatórias.

A velocidade de sedimentação das partículas foi crescente da base para o topo dos digestores, mas, em geral, a velocidade de sedimentação das partículas foi inferior em FAI do que em FAII. À semelhança do que se observou nas amostras analisadas no período operativo anterior, foi detectada uma tendência crescente entre a actividade metanogénica em propionato e a velocidade de sedimentação das partículas (Figura 3.60).

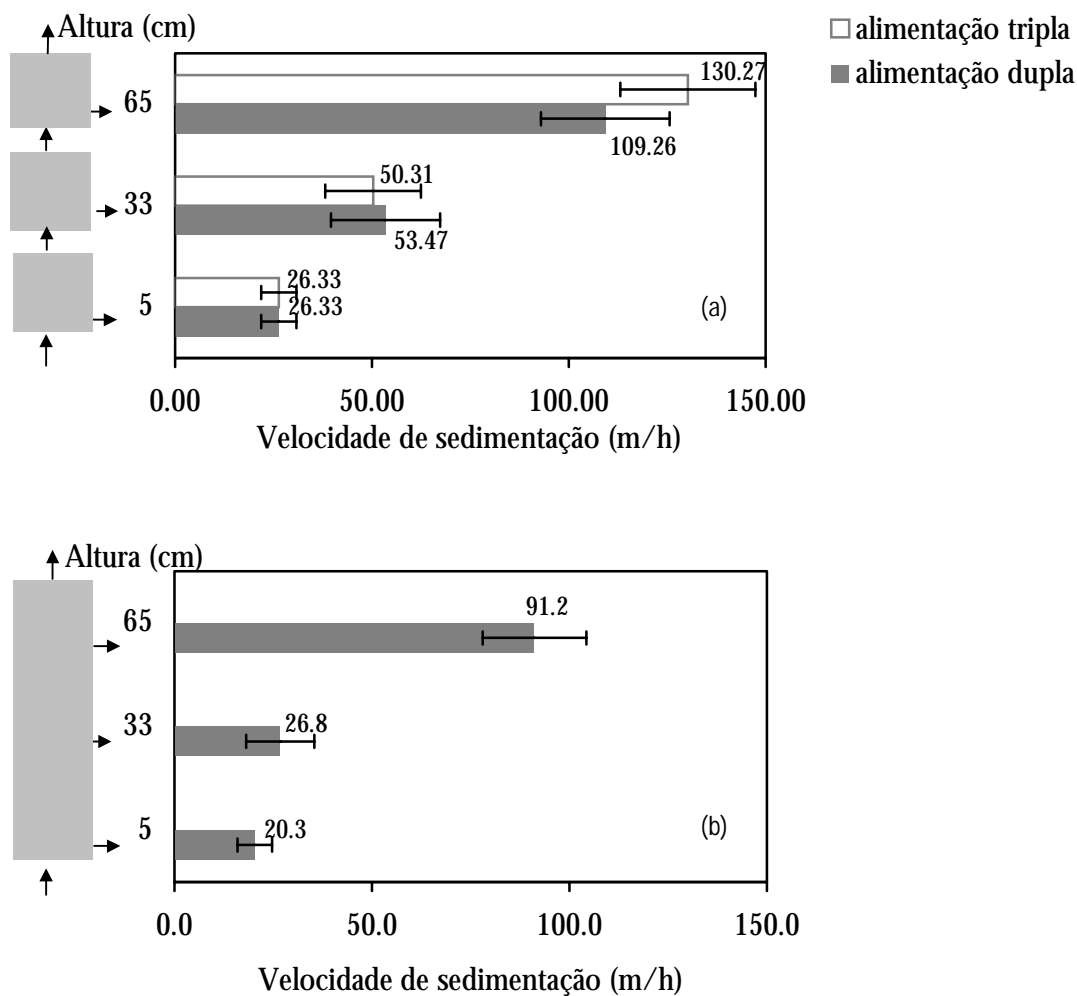


Figura 3.59 Distribuição da velocidade de sedimentação dos agregados em FAII na situação de alimentação dupla e tripla (a) e em FAI (b) para a operação com tempo de retenção de 16 horas e concentração à entrada de 9000 mg CQO/L.

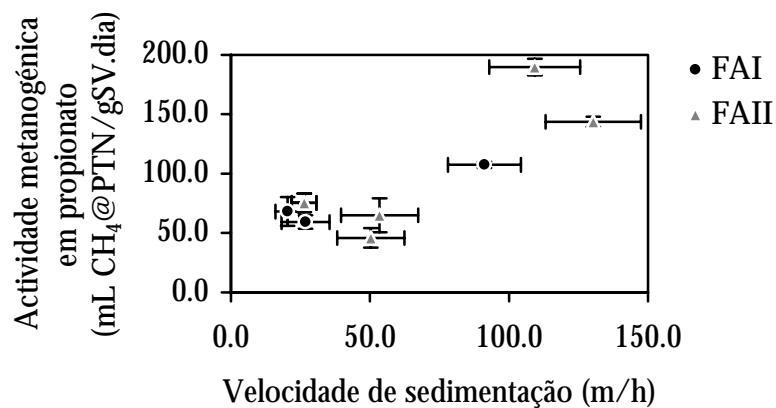


Figura 3.60 Relação entre a actividade metanogénica em propionato e a velocidade de sedimentação dos agregados microbianos presentes em FAI e em FAII.

A dimensão fractal da área projectada dos agregados está representada na Figura 3.61, onde se pode observar que no 3º andar de FAII na situação de alimentação dupla e no topo de FAI as partículas apresentaram uma dimensão fractal bastante superior à observada nas outras secções dos digestores. De facto, nestas condições operatórias foram observadas partículas grandes de forma esférica e de superfície lisa em ambos os digestores.

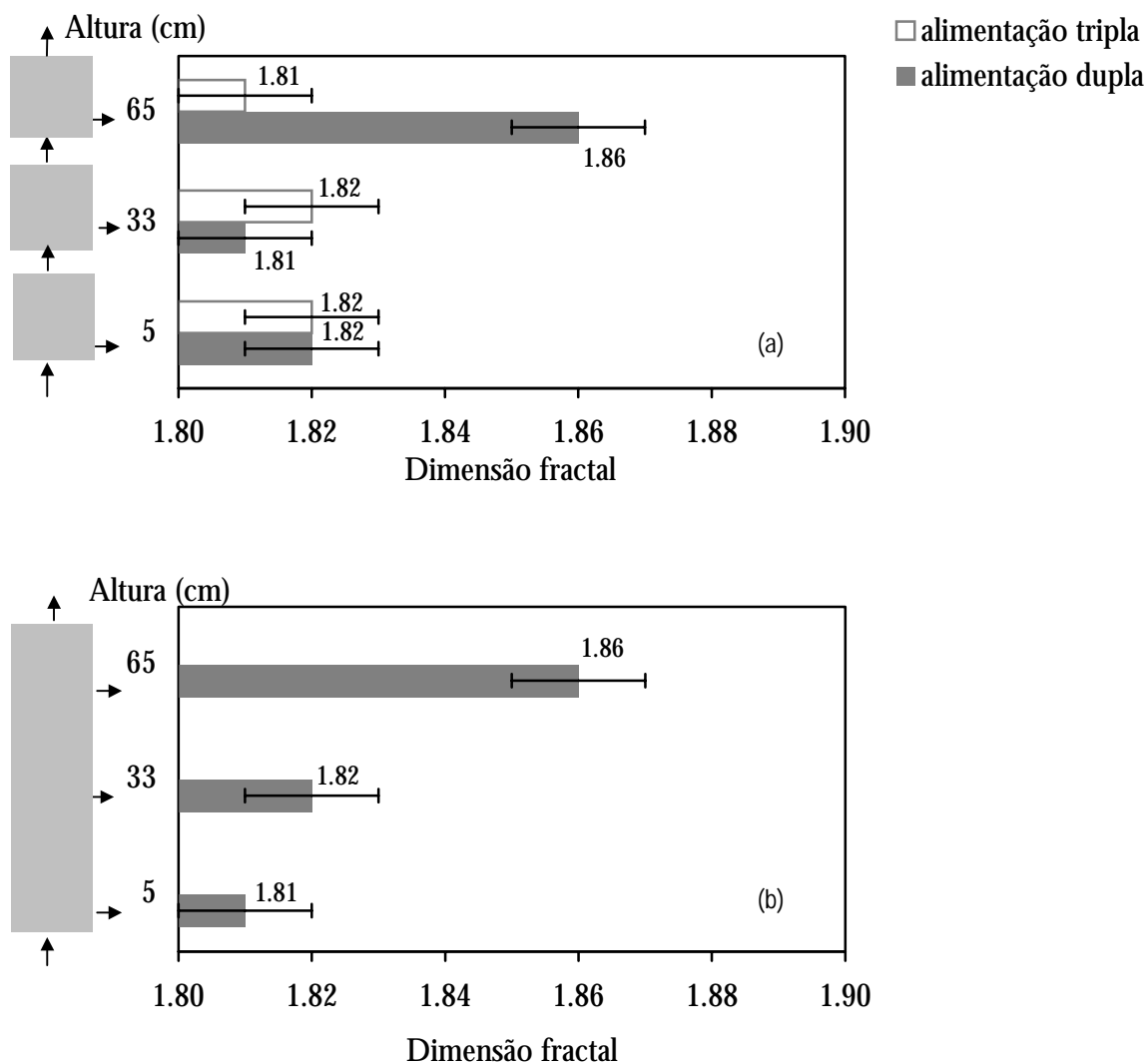


Figura 3.61 Distribuição da dimensão fractal dos agregados em FAII na situação de alimentação dupla e tripla (a) e em FAI (b) para a operação com tempo de retenção de 16 horas e concentração à entrada de 9000 mg CQO/L.

Quando se alterou o esquema de alimentação de dupla para tripla as partículas não só diminuíram de tamanho, mas tornaram-se mais irregulares o que pode ser devido ao crescimento de bactérias acidogénicas a superfície dos agregados.

3.4.4.7 Características hidrodinâmicas

Após se ter distribuído a alimentação em FAII segundo o esquema e os critérios atrás definidos, aumentou-se o caudal por aumento proporcional de todas as correntes, até atingir um tempo de retenção hidráulico de 10 horas. A concentração de substrato foi constante e igual a 9000 mg CQO/L. Em FAI aplicaram-se as mesmas condições operatórias, mantendo a configuração tradicional de modo ascendente com uma única alimentação na base. Nessas condições, a alimentação dos digestores foi conforme o esquema da Figura 3.62, tendo-se realizado experiências de distribuição de tempos de residência em ambos os digestores.

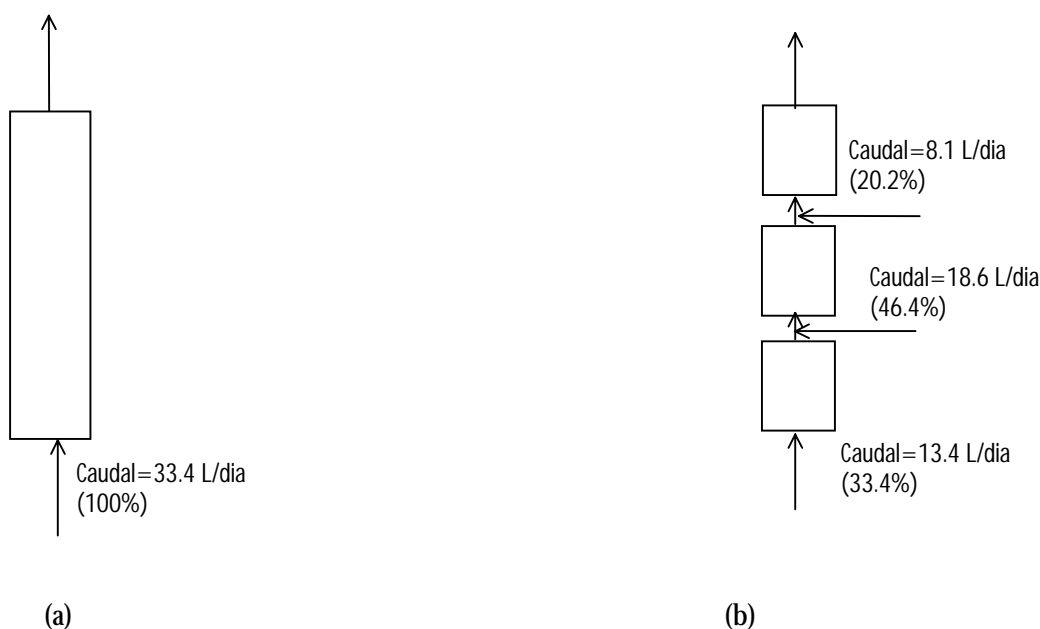


Figura 3.62 Esquema da alimentação dos digestores na situação de alimentação única em FAI (a) e distribuída em FAII (b) para tempo de retenção hidráulico de 10 horas.

Enquanto que em FAI a experiência foi semelhante às que já tinham sido realizadas anteriormente, em FAII optou-se por injectar traçador, separadamente, em cada corrente alimentada, no sentido de avaliar o grau de mistura e o tempo de residência médio de cada corrente. Na Tabela 3.33 estão registados os resultados das experiências e da aplicação do modelo de dispersão. Os resultados da aplicação deste modelo devem ser encarados com reservas dado que o número de dispersão calculado é superior a 1 (LEVENSPIEL 1972),

havendo influência do tipo de fronteira que delimita o volume do sistema. No presente caso as amostras foram recolhidas num tubo de saída ligado a um amostrador automático, pelo que se consideraram condições fronteira fechadas.

Tabela 3.33 Resultados das experiências de DTR em FAI e em cada corrente de alimentação de FAII.

	D/uL	massa de Li ⁺ recuperada (%)	TRM (horas)	TRH (horas)
FAI	24.4	93.1	3.81	10.2
FAII				
alimentação 1º andar	2.43	96.0	9.4	18.5
alimentação 2º andar	4.35	127.0	3.2	8.0
alimentação 3º andar	3.10	70.0	1.4	3.6

D-coeficiente de dispersão longitudinal, u-velocidade superficial, L-comprimento; TRM-tempo de residência médio

Nas injecções à entrada do 2 e do 3º andares, verificou-se um desvio considerável entre a massa de traçador injectada e a massa recuperada. A comparação do tempo de residência médio com o tempo de retenção hidráulico permite concluir que os volumes “mortos” eram elevados, da ordem do 60%, o que significa que apenas 40% do volume do digestor é ocupado pela fase líquida nestas condições. Em FAI, a dispersão aumentou muito significativamente entre a condição de TRH de 2 dias e de 10 horas. Em FAII, se se compararem os valores do número de dispersão com uma alimentação (Tabela 3.18) com os valores obtidos para cada corrente na situação de alimentação distribuída, também se verifica um aumento significativo de dispersão. Este aumento de dispersão pode estar relacionado com as características dos agregados de biomassa que se tornaram bastante mais densos (ver **sub-Capítulo 3.4.4.6**, página 201).

Na Figura 3.63 está representada a curva experimental e a aplicação do modelo de dispersão para a experiência realizada em FAI. Na Figura 3.64, na Figura 3.65 e na Figura 3.66, estão representadas, respectivamente as curvas experimentais e as aplicações do modelo de dispersão para as correntes alimentadas no 1º, 2º e 3º andares de FAII.

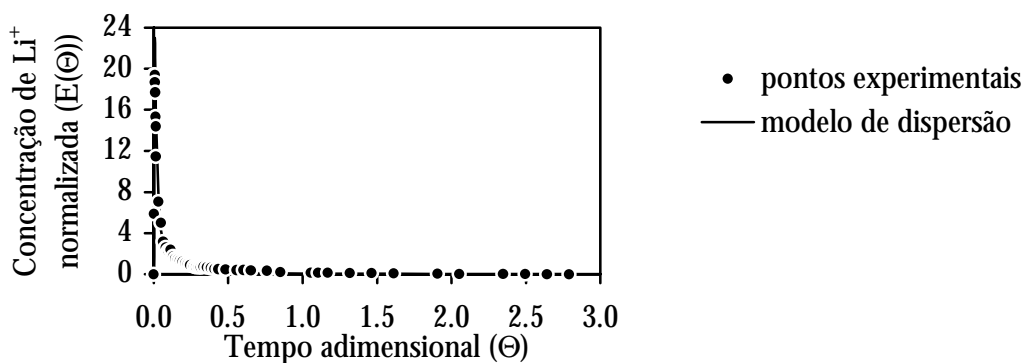


Figura 3.63 Experiência de DTR em FAI para tempo de retenção hidráulico de 10 horas. Aplicação do modelo de dispersão.

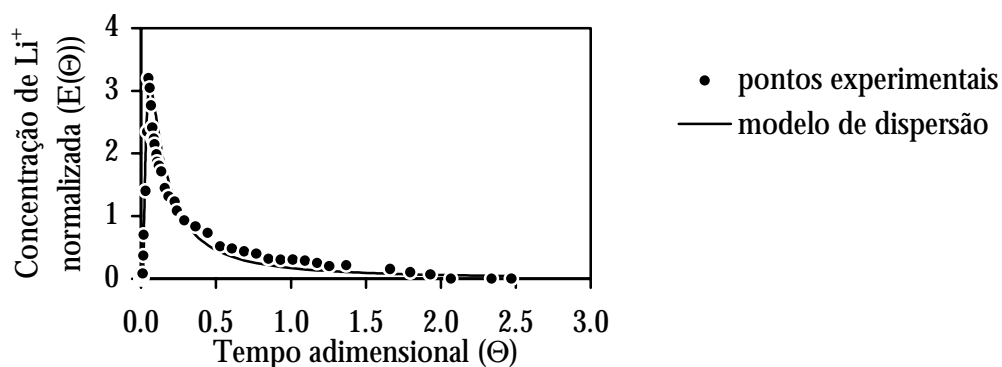


Figura 3.64 Experiência de DTR na corrente alimentada no 1º andar de FAII para tempo de retenção hidráulico de 10 horas. Aplicação do modelo de dispersão.

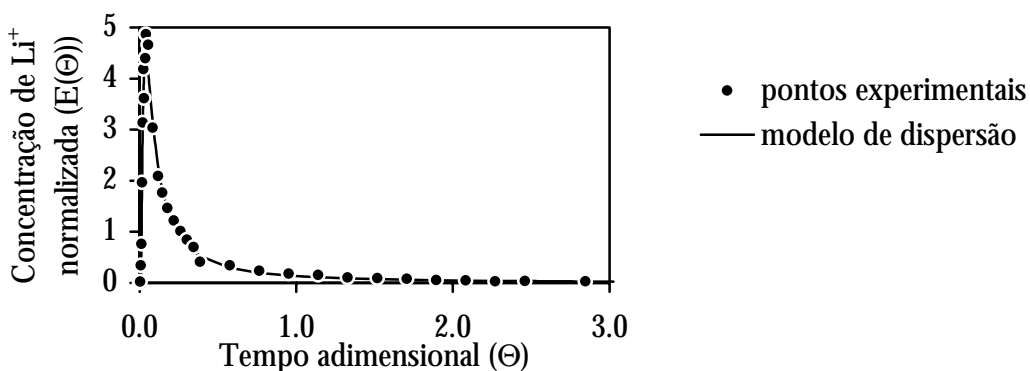


Figura 3.65 Experiência de DTR na corrente alimentada no 2º andar de FAII para tempo de retenção hidráulico de 10 horas. Aplicação do modelo de dispersão.

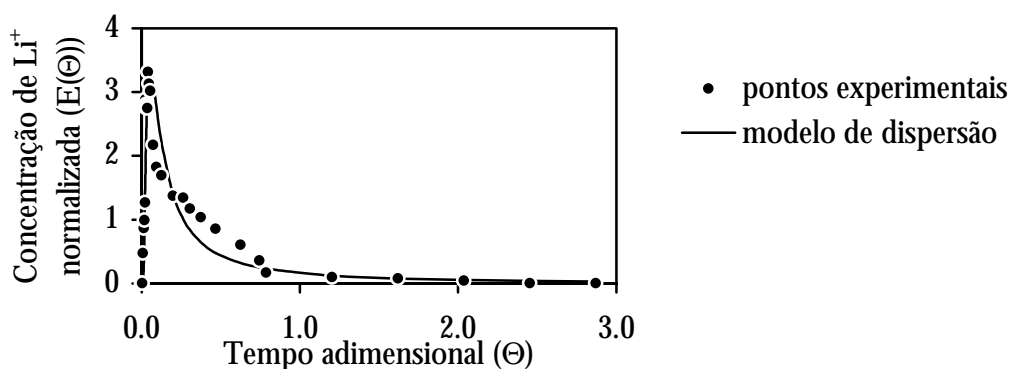


Figura 3.66 Experiência de DTR na corrente alimentada no 3º andar de FAII para tempo de retenção hidráulico de 10 horas. Aplicação do modelo de dispersão.

A saída de traçador imediatamente após a injeção, sugere a existência de curto-circuitos. Este aspecto é muito notório na corrente alimentada no 3º andar (Figura 3.66).

3.4.5 Operação de FAI e FAII com TRH de 10 horas. Alimentação única em FAII e distribuída em FAI.

Nas condições de tempo de retenção hidráulico de 10 horas e alimentação distribuída em FAII, ambas as configurações tinham eficiências de remoção muito semelhantes (FAI 67.9% e FAII 69.3%).

Antes de finalizar o estudo optou-se por testar o comportamento de FAII nas mesmas condições de tempo de retenção hidráulico e concentração de substrato, mas com uma alimentação na base, e proceder à distribuição da alimentação de FAI, de acordo com o esquema que tinha sido seguido em FAII. Assim, a partir do dia 908 de operação, a alimentação dos digestores passou a ser conforme o esquema da Figura 3.67.

Na Figura 3.68 e na Tabela 3.34 está representada a variação da eficiência de remoção de CQO em FAI e FAII ao longo do tempo, comparando-se as situações de alimentação única e distribuída. Verificou-se uma descida acentuada da eficiência em FAI, mas a oscilação dos valores e os largos intervalos de confiança associados sugerem que não foram atingidas condições estacionárias durante este período de tempo.

O efeito de distribuir a alimentação em FAI, nestas condições operatórias, não foi benéfico, em termos de desempenho geral do digestor. No entanto, importa referir que o

esquema segundo o qual se distribuiu a alimentação poderá não ter sido o mais apropriado. A comparação do desempenho de ambos os digestores com alimentação única permite concluir que, nas condições testadas não houve diferenças significativas.

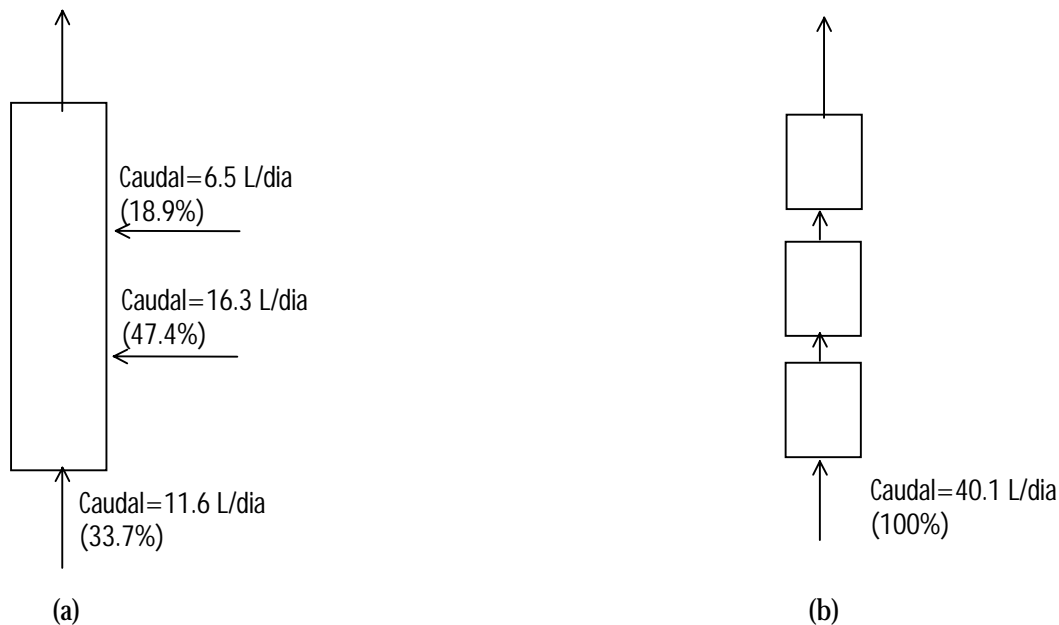


Figura 3.67 Esquema da alimentação dos digestores na situação de alimentação distribuída em FAI (a) e única em FAII (b) para tempo de retenção hidráulico de 10 horas.

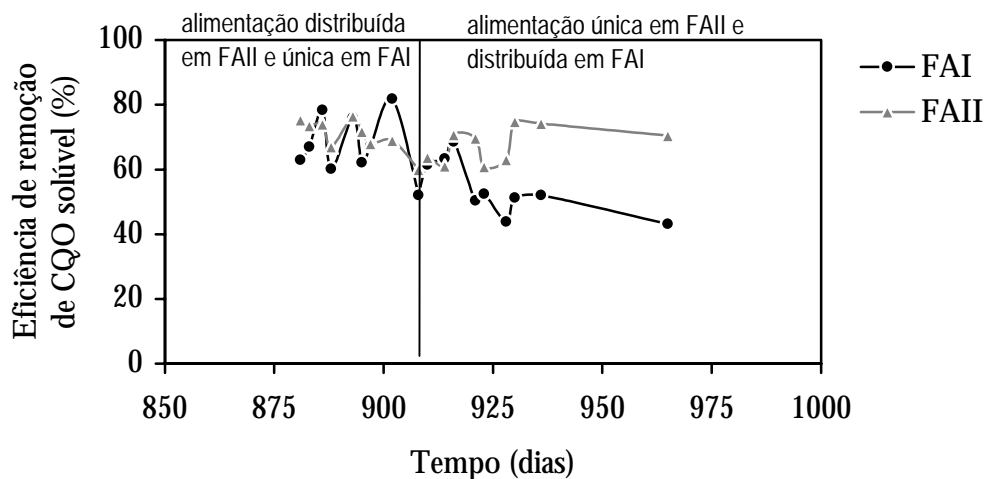


Figura 3.68 Variação da eficiência de remoção de CQO ao longo do tempo durante o período de operação com tempo de retenção de 10 horas.

Tabela 3.34 Desempenho de FAI e FAII com alimentação única e distribuída para tempo de retenção hidráulico de 10 horas e concentração de substrato de 9000 mg CQO/L.

		CQO solúvel à saída (mg/L)	CQO total à saída (mg/L)	Eficiência de remoção CQO solúvel (%)	CH ₄ (%)	biogás (m ³ /m ³ .dia)
FAI	alimentação única	2840±830	6705±898	67.9±9.1	54.8±0.8	9.8±0.2
	alimentação distribuída	4557±637	7205±744	51.7±5.8	53.0±1.6	9.8±1.8
FAII	alimentação única	2880±215	5162±1085.3	69.1±3.6	54.8±13.7	4.9±0.4(*)
	alimentação distribuída	2739±483	5210±475	69.3±4.8	53.4±6.8	2.8±0.5(*)

(*) valores sujeitos a elevado erro experimental

O comportamento de cada andar de FAII está representado na Figura 3.69. A carga orgânica aplicada no 1º andar aumentou de 20 para 64 kg CQO/m³.dia, tendo a eficiência baixado desde 64 até um mínimo de 35%. Provavelmente a eficiência neste andar continuaria a baixar, se se tivesse prolongado o tempo da experiência.

No 2º andar a carga orgânica aplicada aumentou, em termos médios, de 34 para 39 kg CQO/m³.dia, mas a eficiência decresceu acentuadamente de 46% (em média) para 10% (em média), tendo-se registado alguns valores nulos.

No 3º andar a carga orgânica aplicada média aumentou entre 30 e 35 kg CQO/m³.dia e a eficiência de remoção mostrou uma tendência pontual decrescente, mas recuperou e, em termos médios, aumentou de 40 para 44%.

Tal como já tinha sucedido durante a operação sem adição de nutrientes (sub capítulo 3.4.1, página 124), em que o 2º andar era o menos eficiente, também se verificou nesta experiência que este andar era o mais sensível às variações das condições operatórias. Por outro lado, durante a operação com alimentação dupla, foi este andar que apresentou melhor desempenho. Para TRH de 2 dias tinha sido detectada uma elevada actividade em propionato no 2º andar. As bactérias consumidoras de propionato são extremamente sensíveis à pressão parcial de hidrogénio (DOLFING, 1988). Uma modificação do ambiente em hidrogénio, por variação das condições de saída do 1º andar, pode alterar as relações de simbiose e desestabilizar o sistema.

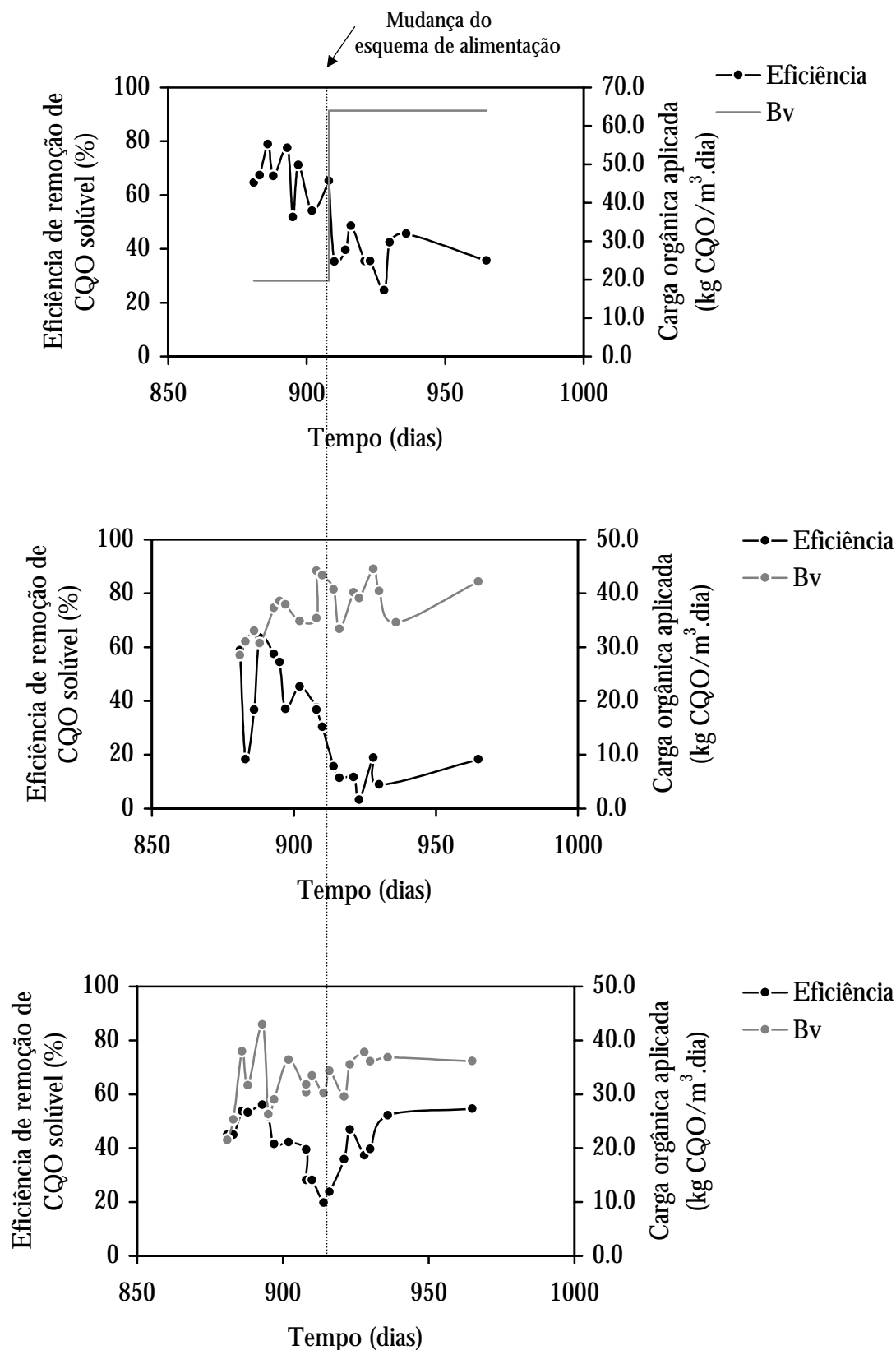


Figura 3.69 Eficiência de remoção e carga orgânica aplicada em cada andar de FAII. 1º andar (a), 2º andar (b) e 3º andar (c).

3.4.6 Caracterização da biomassa no final da operação

No final da operação os digestores foram abertos e as fracções de biomassa aderida e oclusa foram determinadas de acordo com o procedimento descrito no **sub-Capítulo 3.3.4.1**, página 113.

3.4.6.1 Distribuição da biomassa no suporte

Na Figura 3.70 e na Figura 3.71 está representada, respectivamente, a distribuição da biomassa oclusa e aderida para as várias secções de ambos os digestores.

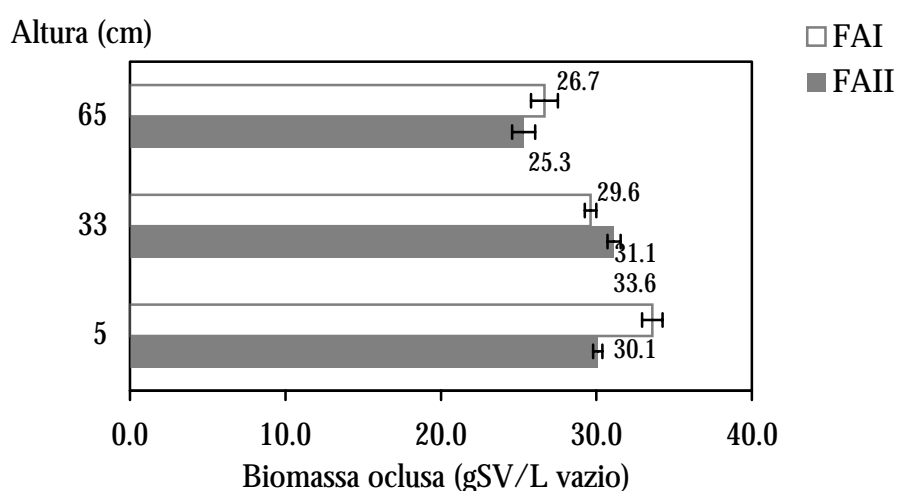


Figura 3.70 Distribuição da biomassa oclusa ao longo da altura de FAI e de FAII no final da operação.

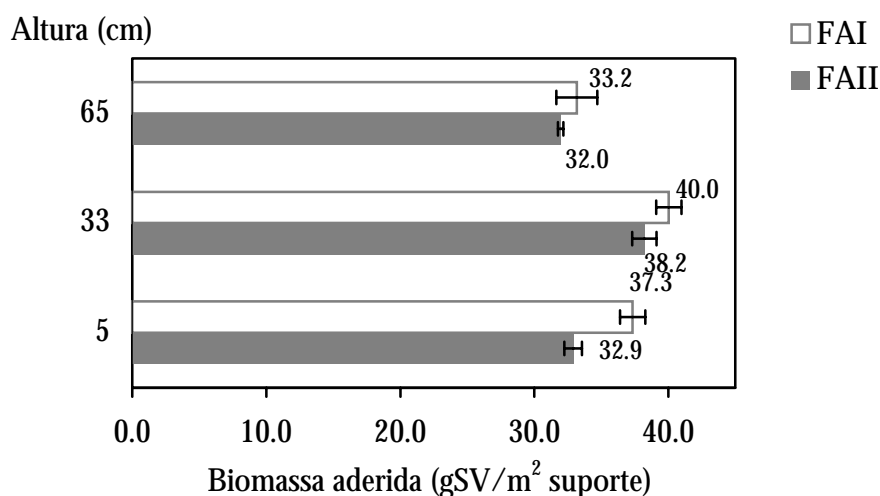


Figura 3.71 Distribuição da biomassa aderida ao longo da altura de FAI e de FAII no final da operação.

As diferenças entre as duas configurações são pequenas, para ambas as formas de biomassa. A biomassa oclusa teve uma tendência ligeiramente decrescente com a altura dos digestores e a biomassa aderida apresentou um máximo na secção do meio de FAI e no 2º andar de FAII, que pode ter sido induzido pela introdução de substrato neste ponto dos digestores. Contudo, as diferenças entre os valores obtidos nas várias secções não ultrapassaram os 25% para a biomassa oclusa e os 17% para a biomassa aderida.

Salientam-se as elevadas concentrações de biomassa oclusa e aderida obtidas para ambos os digestores. DAHAB E YOUNG (1982) determinaram valores de 30 e de 50 g VSS/L vazio, na secção da base de um filtro anaeróbio a operar com cargas orgânicas de 8 e de 16 kg CQO/m³.dia, utilizando um efluente sintético com sacarose, AGV e alcoóis. SOTO *et al.* (1992) registaram valores de VSS da ordem dos 16 g VSS/L, num filtro anaeróbio laboratorial alimentado com o efluente real de uma unidade de processamento de mexilhão.

Na Figura 3.72 está representada a fracção de biomassa aderida ao longo da altura em ambos os digestores, onde se pode observar que o máximo atingido não ultrapassou os 25%. No **Capítulo 4**, página **233** obteve-se uma fracção máxima de biomassa aderida de 40%, ao fim de 246 dias de operação com um substrato semelhante ao do presente trabalho. Contudo as condições de tempo de retenção foram diferentes, o que deve condicionar a espessura e a densidade do biofilme.

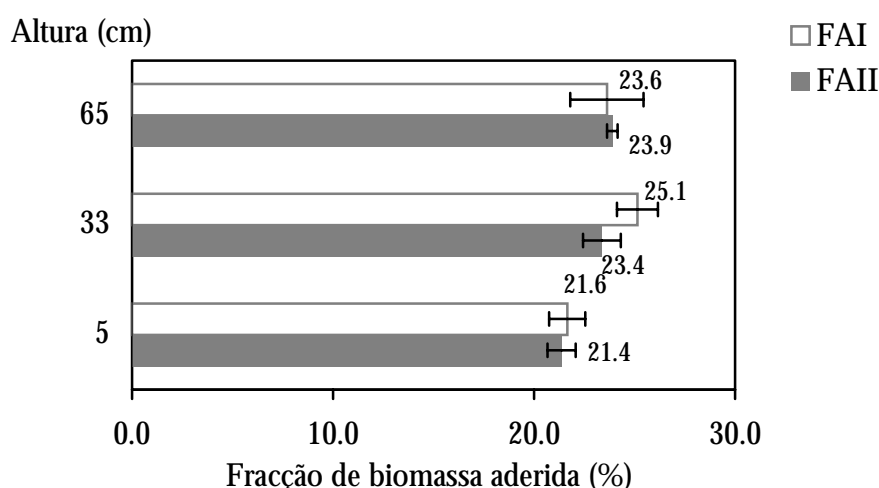


Figura 3.72 Distribuição da fracção de biomassa aderida ao longo da altura de FAI e de FAII no final da operação.

A fracção de sólidos voláteis da biomassa oclusa diminuiu da base para o topo em ambos os digestores (Figura 3.73), o que indica uma maior acumulação de precipitados inorgânicos no topo dos digestores. Este aspecto tinha já sido referido anteriormente na caracterização da biomassa durante o período de operação com TRH constante em 2 dias. Além disso observou-se uma maior fracção de sólidos inorgânicos em FAII do que em FAI.

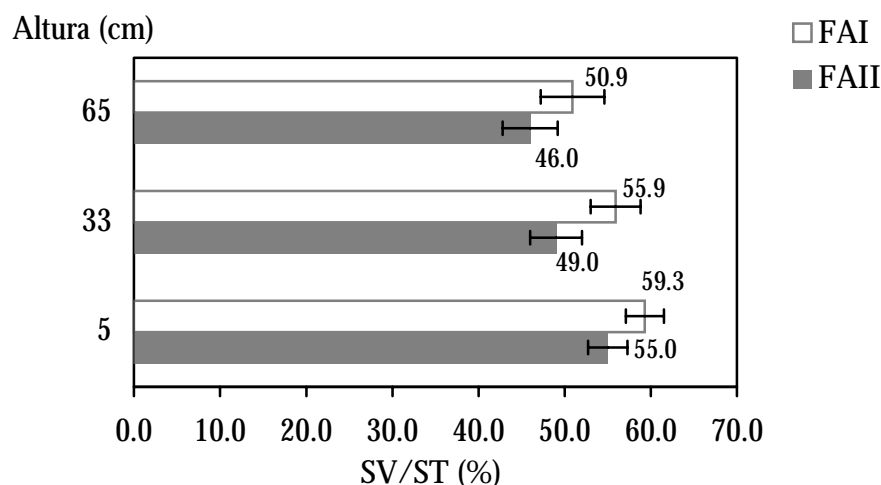


Figura 3.73 Distribuição de fracção de sólidos voláteis ao longo da altura de FAI e de FAII no final da operação.

3.4.6.2 Caracterização biológica e física da biomassa

A biomassa oclusa recolhida no final da operação, que representou 75 a 80% da biomassa total retida, foi caracterizada em termos dos parâmetros utilizados nas caracterizações anteriores: actividades metanogénicas, tamanho, velocidade de sedimentação e dimensão fractal.

Na Figura 3.74 está representada a actividade metanogénica acetoclástica para ambos os digestores. Verificou-se que em FAII (que no final da operação estava a operar com uma única alimentação na base), a actividade acetoclástica estava estratificada, aumentando acentuadamente da base para o topo do digestor. Detectou-se uma actividade acetoclástica apreciável no 1º andar, o que era inesperado, face à elevada carga orgânica aplicada neste andar, no último período operativo (64 kgCQO/m³.dia).

O facto da concentração de biomassa ser muito elevada e do volume “morto”, tal como calculado pelas experiências de DTR, ser da ordem dos 60%, sugere que o filtro estava praticamente colmatado com biomassa. Nessas condições, o fluxo do líquido e do biogás é feito em pequenos canais que se formam através de uma manto compacto de biomassa.

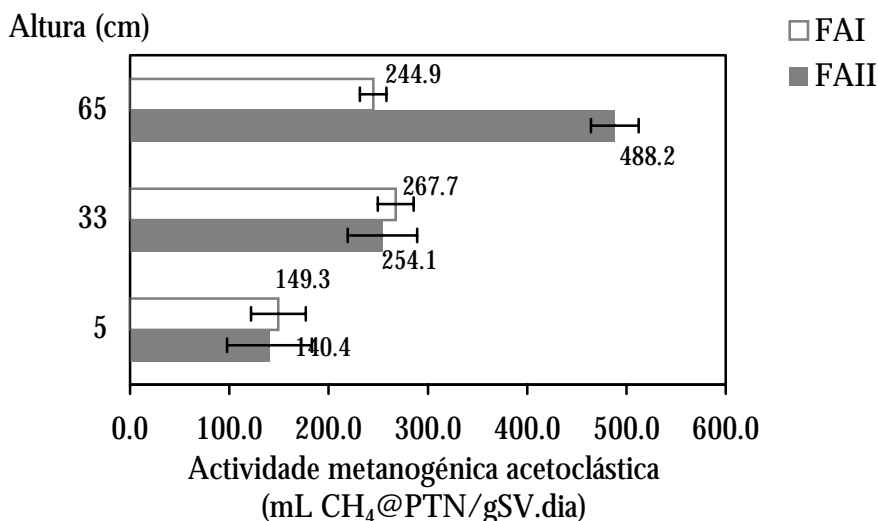


Figura 3.74 Distribuição de actividade metanogénica acetoclástica ao longo da altura de FAI e de FAII no final da operação.

A biomassa que contacta directamente com o líquido é apenas uma fracção mínima da biomassa total presente no sistema, sendo a maior parte afectada por fortes limitações difusionais de substratos e produtos. As condições de carga impostas são na realidade muito superiores às calculadas com base no volume total do digestor, mas a biomassa que não contacta directamente com o fluido, recebe o efeito das condições aplicadas de uma forma atenuada, devido aos efeitos difusionais já referidos, sendo provável uma segregação da biomassa em termos radiais devido a esse efeito. Uma vez que se caracterizaram amostras representativas da biomassa total removida das várias secções do digestor, os resultados representam, em termos médios, as contribuições de diferentes tipos de biomassa, mais ou menos afectada pelas condições operatórias impostas. Em FAI a actividade acetoclástica foi mais homogénea ao longo da altura do digestor.

Relativamente à actividade hidrogenofílica (Figura 3.75), verificou-se também uma maior estratificação em FAII do que em FAI, mas em ambos os digestores esta actividade aumentou da base para o topo.

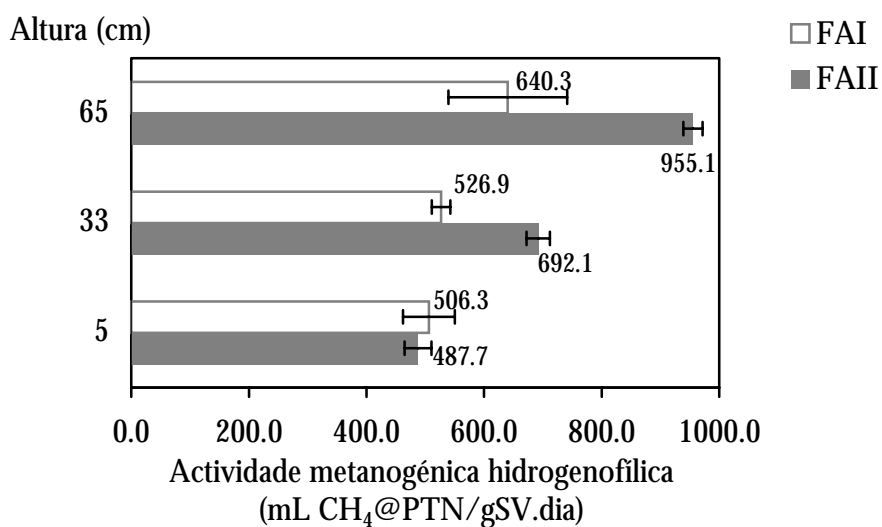


Figura 3.75 Distribuição da actividade metanogénica hidrogenofílica ao longo da altura de FAI e de FAII no final da operação.

A distribuição da actividade em lactose está representada na Figura 3.76 e, mais uma vez se verifica uma maior estratificação em FAII do que em FAI, diminuindo da base para o topo dos digestores. Os valores não sofreram variações significativas relativamente aos valores anteriormente determinados.

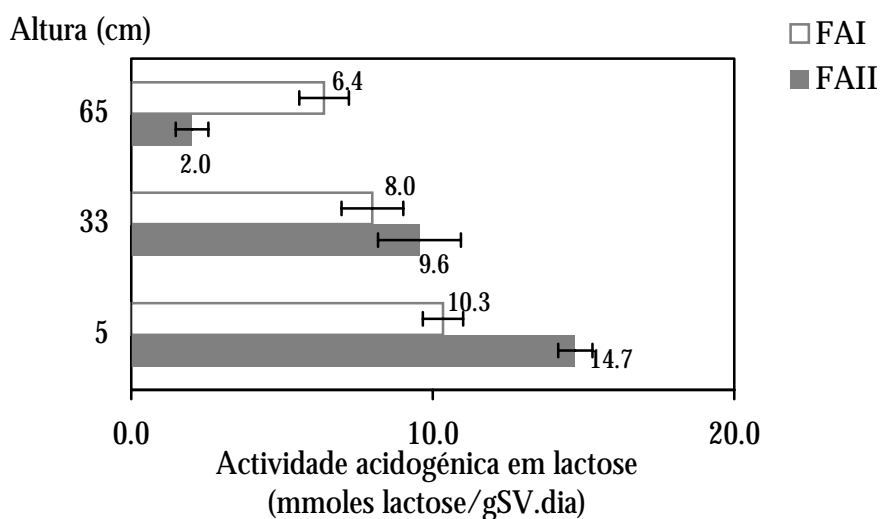


Figura 3.76 Distribuição de actividade acidogénica em lactose ao longo da altura de FAI e de FAII no final da operação.

A actividade metanogénica em propionato foi superior no digestor segmentado (FAII), e manteve-se a tendência de menor actividade em propionato no 2º andar e máxima actividade no topo. Em FAI a actividade foi crescente da base para o topo do digestor.

A actividade metanogénica em butirato foi muito baixa, tendo sido detectados valores nulos em todas as secções de FAI e no 3º andar de FAII (não são apresentados valores desta actividade).

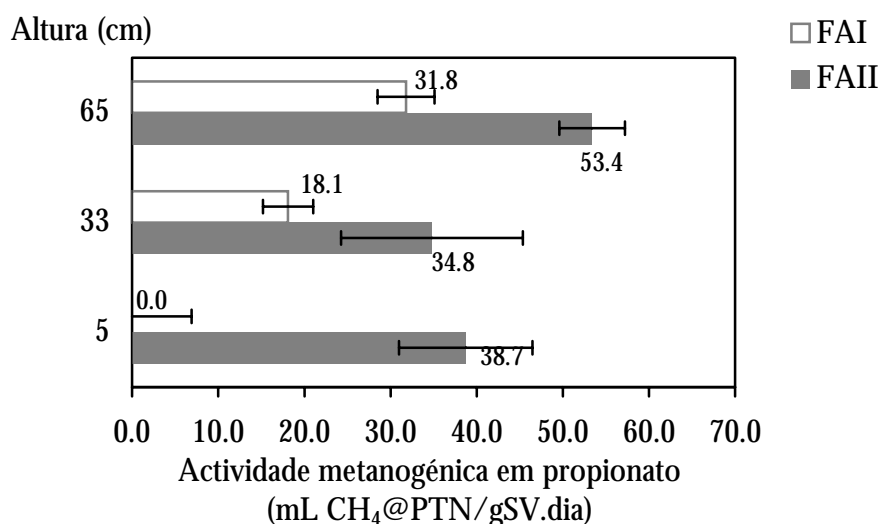


Figura 3.77 Distribuição de actividade metanogénica em propionato ao longo da altura de FAI e de FAII no final da operação.

De um modo geral, todas as actividades medidas foram superiores em FAII o que pode justificar a maior eficiência deste digestor relativamente a FAI, no final da operação.

O tamanho dos agregados variou relativamente à caracterização com tempo de retenção de 16 horas (Figura 3.78). Verificou-se uma homogenização do tamanho dos agregados ao longo da altura e não se detectaram diferenças significativas entre FAI e FAII.

Na Figura 3.79 está representada a velocidade de sedimentação dos agregados microbianos, verificando que decresceu relativamente à operação com tempo de retenção de 16 horas. Em FAII a máxima velocidade de sedimentação foi medida para as partículas do topo que eram ligeiramente mais pequenas do que as presentes nas outras secções do digestor. Em FAI a velocidade de sedimentação das partículas diminuiu entre 50 e 36 m/h da base para o topo.

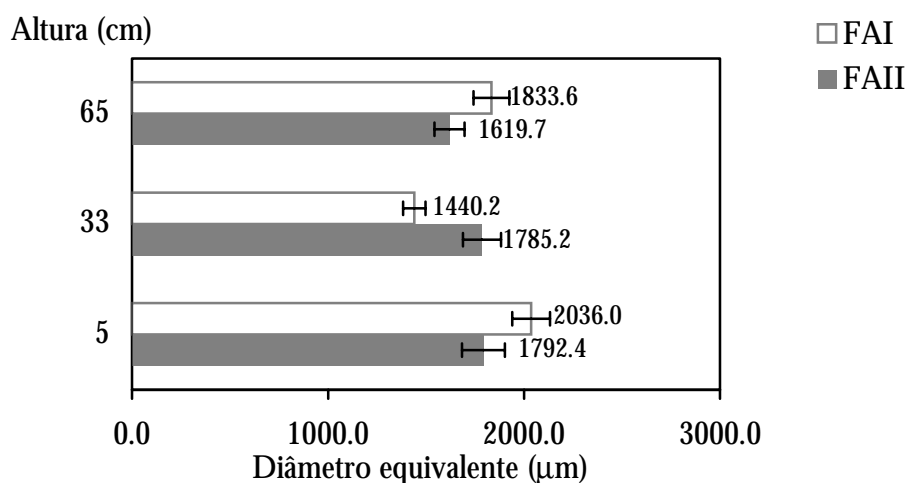


Figura 3.78 Distribuição do tamanho dos agregados ao longo da altura de FAI e de FAII no final da operação.

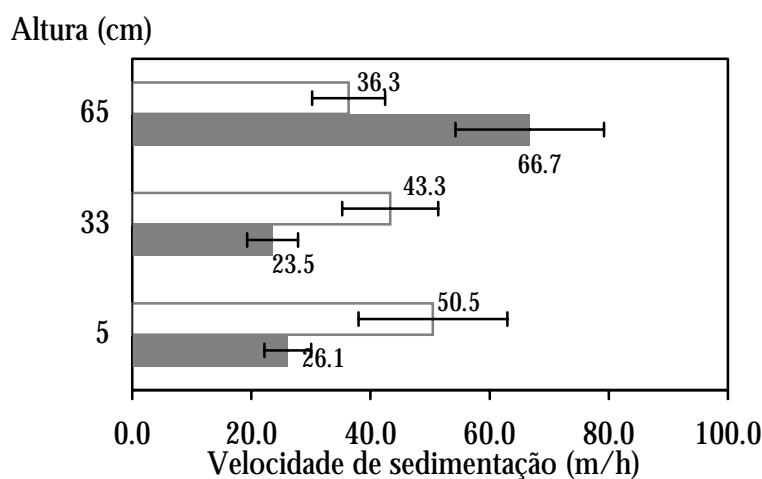


Figura 3.79 Distribuição da velocidade de sedimentação dos agregados ao longo da altura de FAI e de FAII no final da operação.

A análise da dimensão fractal dos agregados (Figura 3.80) permite concluir que estes se tornaram mais rugosos do que durante a operação com TRH de 16 horas e as diferenças entre os dois digestores não são significativas, excepto na base, em que se observa uma menor dimensão fractal da biomassa de FAII, provavelmente por crescimento de biomassa acidogénica.

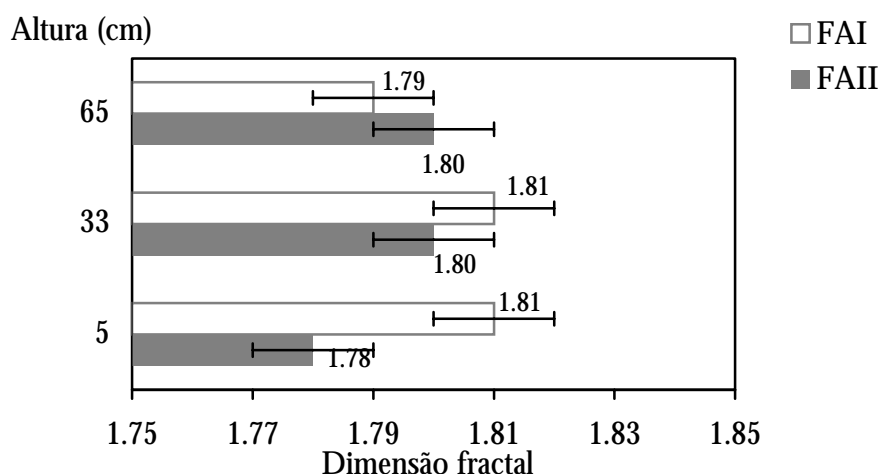


Figura 3.80 Distribuição da dimensão fractal dos agregados ao longo da altura de FAI e de FAII no final da operação.

3.4.7 Variação das características biológicas e físicas da biomassa com o tempo de operação e com as condições operatórias

Ao longo de toda a operação a actividade metanogénica e acidogénica e as características físicas dos agregados sofreram alterações que se foram descrevendo cronologicamente. A comparação para ambos os digestores da variação dessas propriedades nas várias secções permite evidenciar a semelhança de comportamento entre as duas configurações. Na Figura 3.81 está representada a variação ao longo do tempo da actividade acetoclástica nas várias secções de FAI e nos três andares de FAII.

Em ambos os digestores a actividade acetoclástica passou por um máximo registado em todas as secções no dia 809 de operação, a que correspondeu a operação com TRH de 16 horas, concentração de substrato à entrada de 9000 mg CQO/L, alimentação dupla em FAII e alimentação única em FAI. Após este dia, a actividade acetoclástica decresceu em todas as secções de ambos os digestores. Da comparação entre as duas configurações (Figura 3.81 (a) e (b)), pode concluir-se que a alteração das condições operatórias induzia maiores variações na actividade acetoclástica desenvolvida na configuração segmentada do que na configuração não segmentada. Este facto traduziu-se por uma maior amplitude dos valores medidos desta actividade em FAII do que em FAI, o que pode ser naturalmente

decorrente das alterações impostas nas condições operatórias, nomeadamente das alimentações múltiplas, mas também pode sugerir uma maior instabilidade operacional da configuração segmentada relativamente à não segmentada. No entanto este aspecto não foi comprovado com os resultados obtidos nas condições operatórias testadas.

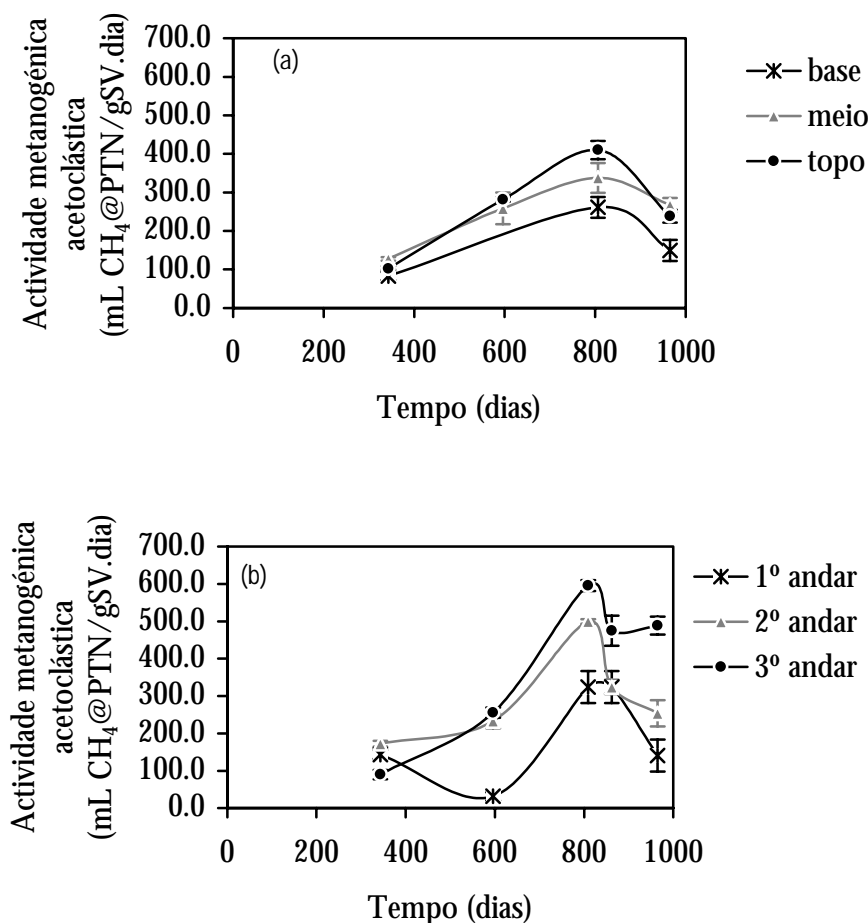


Figura 3.81 Variação ao longo do tempo da actividade metanogénica acetoclástica em cada secção de FAI (a) e de FAII (b).

A variação da actividade hidrogenofílica está representada na Figura 3.82. Em FAI houve uma tendência decrescente desta actividade, em particular nas secções do meio e do topo. Na base, a actividade atingiu um máximo no dia 809 decrescendo posteriormente, após a distribuição da alimentação. Em FAII a tendência foi de estabilidade desta actividade em cada secção, sendo em geral a actividade crescente do 1º para o 3º andar. No final da operação e após se ter localizado a entrada de toda a alimentação na base do digestor, a

actividade hidrogenofílica diminuiu acetuadamente no 1º andar.

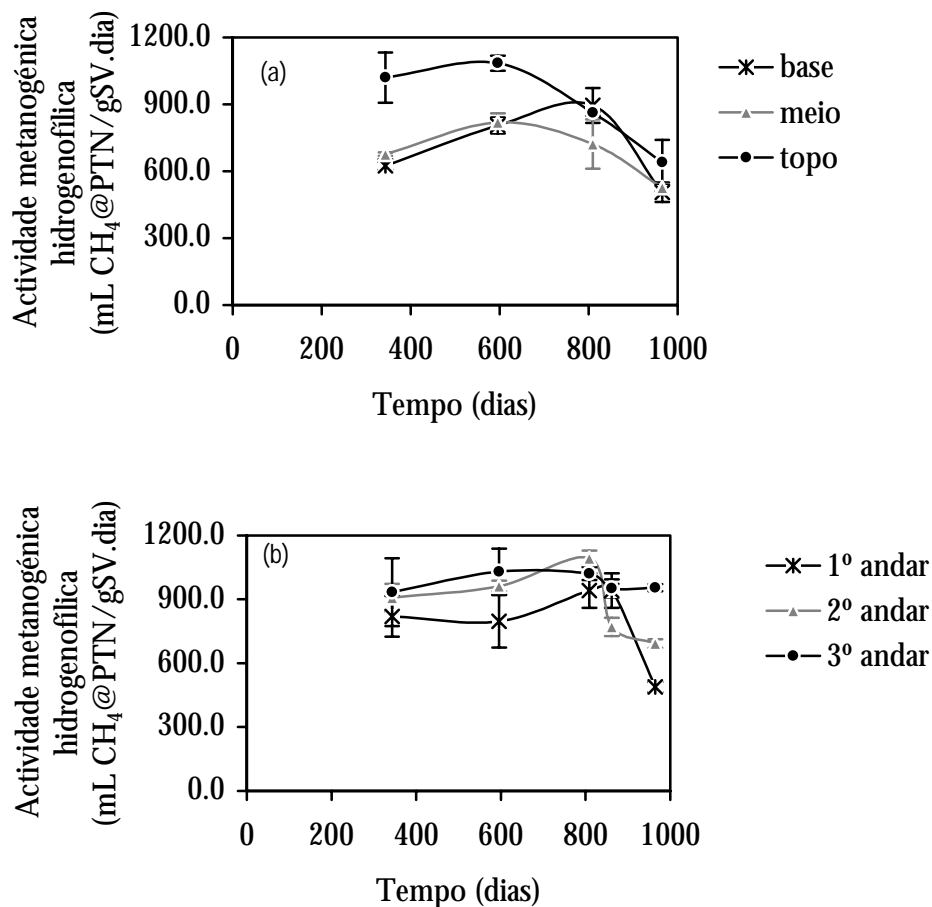


Figura 3.82 Variação ao longo do tempo da actividade metanogénica hidrogenofílica em cada secção de FAI (a) e de FAII (b).

A actividade específica de degradação de lactose está representada na Figura 3.83. Enquanto que em FAI esta actividade atingiu, no dia 809 de operação, um máximo em todas as secções, em FAII observou-se que, no 1º andar, a actividade manteve-se aproximadamente constante, tendo aumentado no final da operação e que no 2º andar atingiu um máximo evidente nos dias 809 e 862 de operação, correspondentes à situação de alimentação dupla e tripla. No 3º andar também se registou um máximo nesses períodos, tendo decrescido posteriormente, após a localização de toda a alimentação na entrada do digestor. De salientar que o máximo de actividade em lactose obtido no dia 862 de operação é muito superior aos valores registados na base do digestor não segmentado e na base do

digestor segmentado com alimentação única.

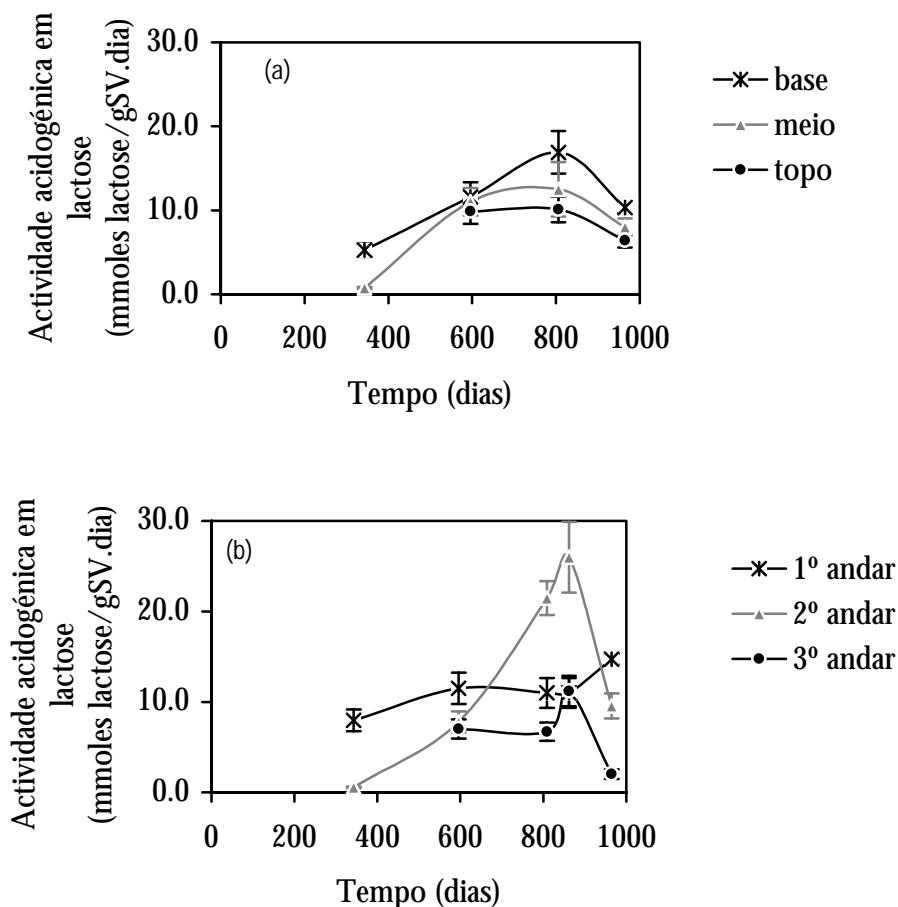


Figura 3.83 Variação ao longo do tempo da actividade acidogénica em lactose em cada secção de FAI (a) e de FAII (b).

Relativamente à actividade em propionato que está representada na Figura 3.84, pode observar-se que, no 2º andar, esta actividade atingiu um máximo em ambos os digestores, no dia 596, a que correspondeu a operação com TRH de 2 dias e concentração à entrada de 9000 mg CQO/L e alimentação única em ambos os digestores, e decresceu posteriormente até ao final da operação. No topo de ambos os digestores esta actividade passou por um máximo nítido no dia 809, sendo mais uma vez superior em FAII do que em FAI.

No final da operação, a actividade em propionato detectada decresceu acentuadamente em todas as secções de ambos os digestores. Salienta-se mais uma vez a semelhança entre o comportamento da actividade em propionato em FAI e em FAII.

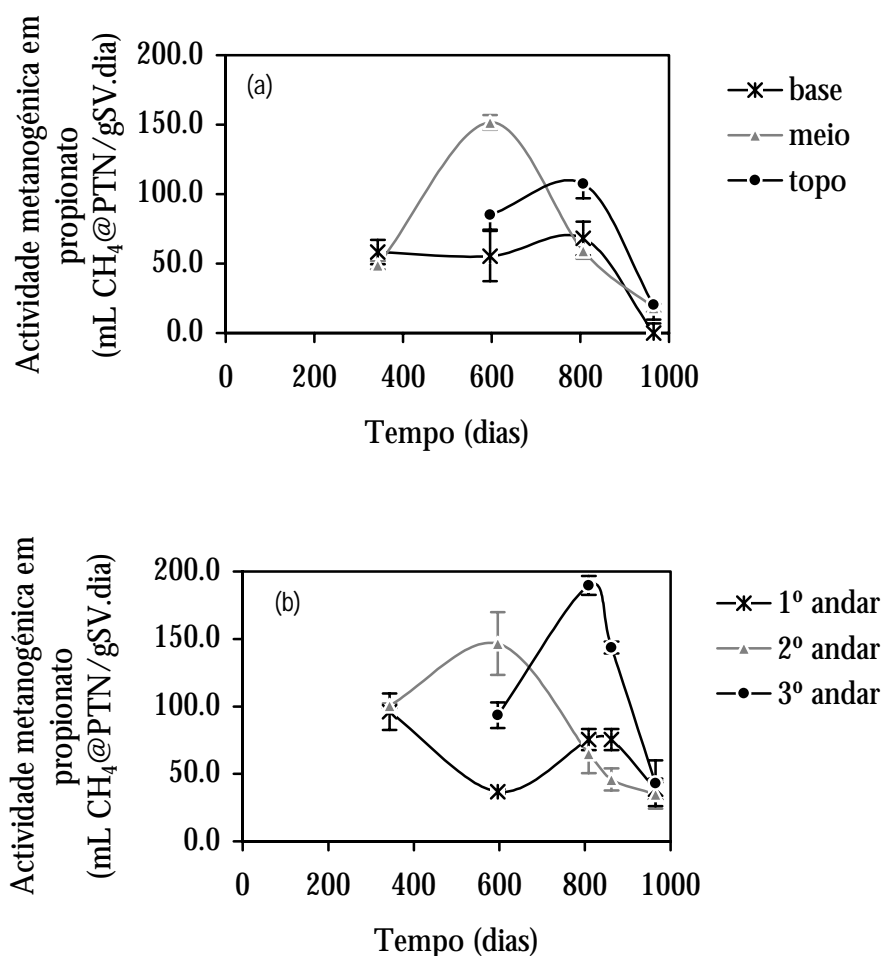


Figura 3.84 Variação ao longo do tempo da actividade metanogénica em propionato em cada secção de FAI (a) e de FAII (b).

Esta semelhança é também evidente na variação da actividade em butirato (Figura 3.85). Em ambos os digestores esta actividade apresentou uma variação oscilante na base e no topo, com mínimos no dia 596 e máximos no dia 809. Em FAI registaram-se valores superiores aos registados em FAII, excepto no final da operação.

A diminuição acentuada de todas as actividades no final da operação pode ser explicada pelo diferente método de amostragem utilizado relativamente às amostras anteriores. Ao longo da operação retiraram-se amostras de biomassa na base de cada andar do digester segmentado e em alturas similares do digester não segmentado.

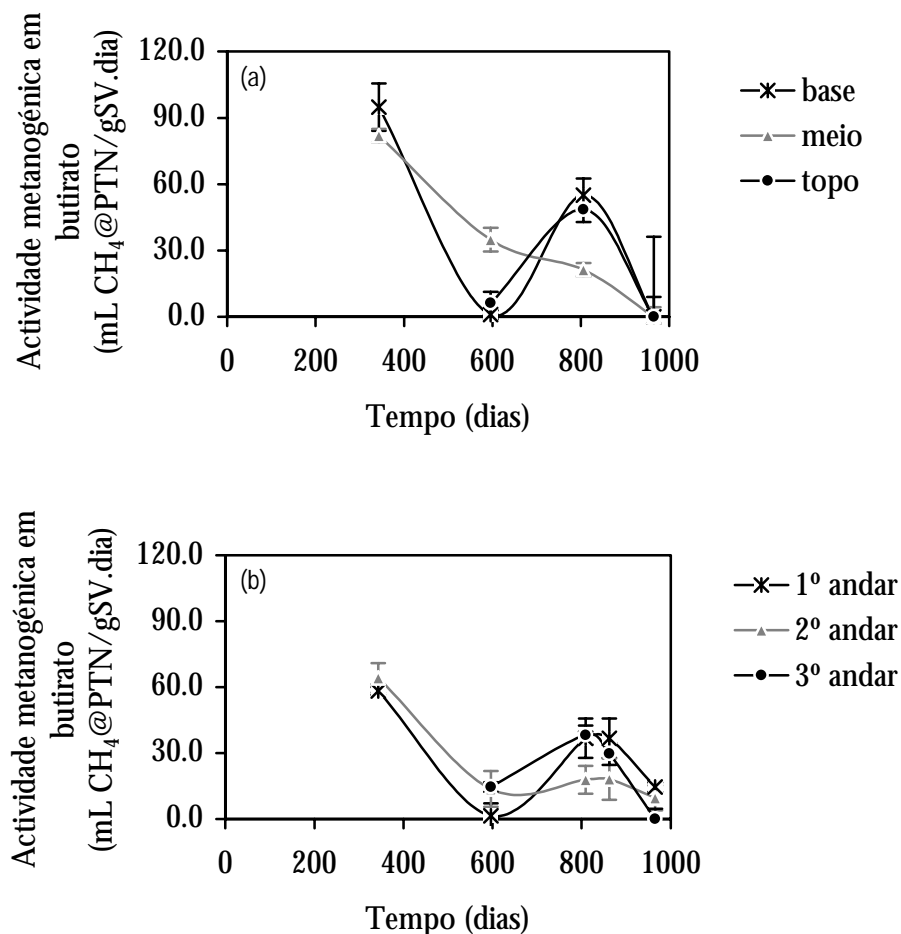


Figura 3.85 Variação ao longo do tempo da actividade metanogénica em butirato em cada secção de FAI (a) e de FAII (b).

No final da operação removeu-se a biomassa total de cada andar e separou-se a biomassa de FAI por secções. Homogeneizou-se e retirou-se uma amostra representativa. Sendo de esperar que em cada andar de FAII e à semelhança do que acontece com o digestor não segmentado, haja uma estratificação da biomassa ao longo da sua altura, é natural que os valores de actividade obtidos nas amostras retiradas na base dos andares sejam diferentes dos obtidos no fim da operação em que era amostrada a totalidade da biomassa. Por outro lado a diminuição geral da actividade também pode ser devida a uma acumulação gradual de matéria orgânica inerte constituída por biomassa não viável, que não tenha sido amostrada convenientemente ao longo da operação. De facto, enquanto que nas amostras retiradas nos dois primeiros pontos (dia 343 e 596) não houve problemas de amostragem da fase sólida, nas amostras dos dias 809 e 862 foi difícil retirar sólidos do digestor, devido ao entupimento

das portas de amostragem. Tentou-se homogeneizar a secção de onde se retiravam as amostras, de modo a minimizar as variações radiais que pudessem ocorrer, e prolongou-se o processo de amostragem, sendo retirada uma pequena porção de sólidos oclusos de cada vez.

A semelhança de comportamento entre FAI e FAII nas condições operatórias testadas estendeu-se às características de tamanho, velocidade de sedimentação e rugosidade da superfície dos agregados (Figura 3.86, Figura 3.87 e Figura 3.88).

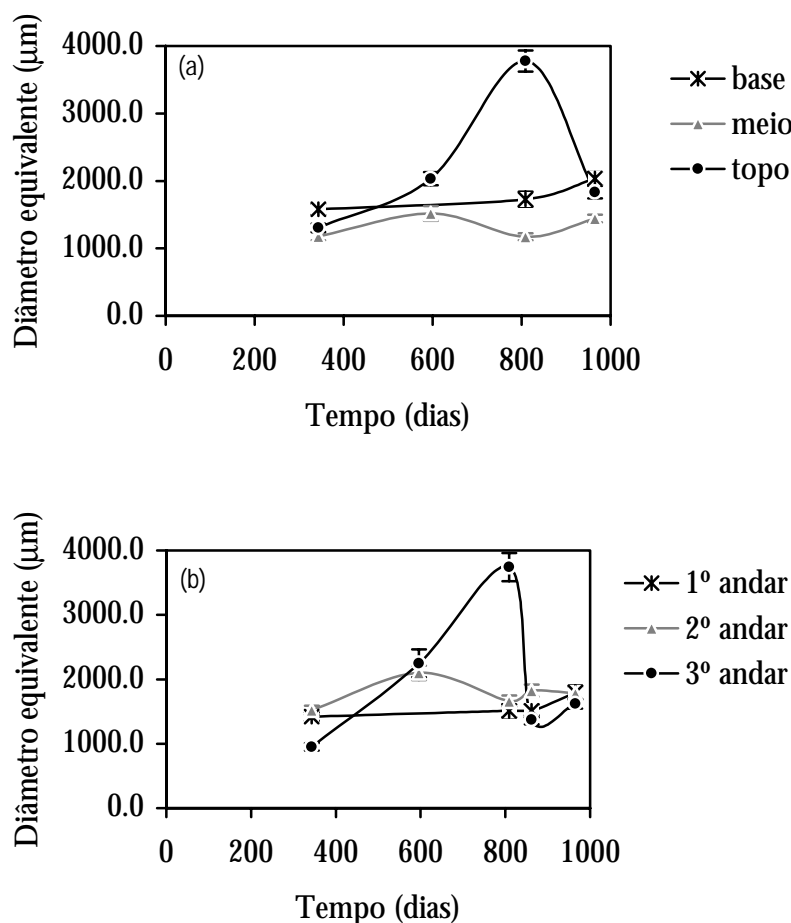


Figura 3.86 Variação ao longo do tempo do diâmetro equivalente dos agregados em cada secção de FAI (a) e de FAII (b).

Enquanto que na base e no meio dos digestores estas características se mantiveram relativamente homogêneas ao longo da operação, no topo dos digestores foi observado um aumento acentuado de todas as propriedades no dia 809 em ambos os digestores. Em termos médios a velocidade de sedimentação dos agregados de FAII foi superior à dos de

FAI, mas não se detectaram diferenças evidentes no tamanho e na rugosidade dos agregados.

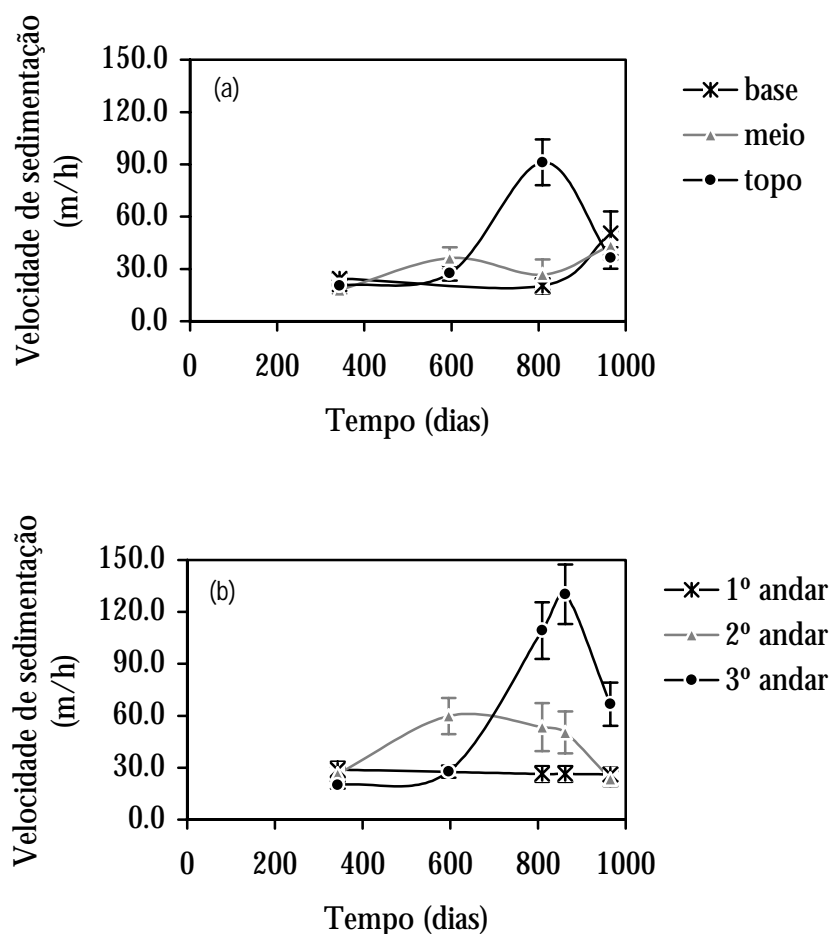


Figura 3.87 Variação ao longo do tempo da velocidade de sedimentação dos agregados em cada secção de FAI (a) e de FAII (b).

A biomassa presente no topo dos digestores no dia 809 caracterizou-se por elevado tamanho, elevadas velocidades de sedimentação. A superfície dos agregados era mais lisa do que a dos agregados presentes nas outras secções dos digestores. Estas características são comuns em agregados granular presentes nos digestores de manto de lamas. A granulação em filtros anaeróbios já foi referida na literatura embora a sua importância não esteja bem definida (YOUNG E MCCARTY, 1967).

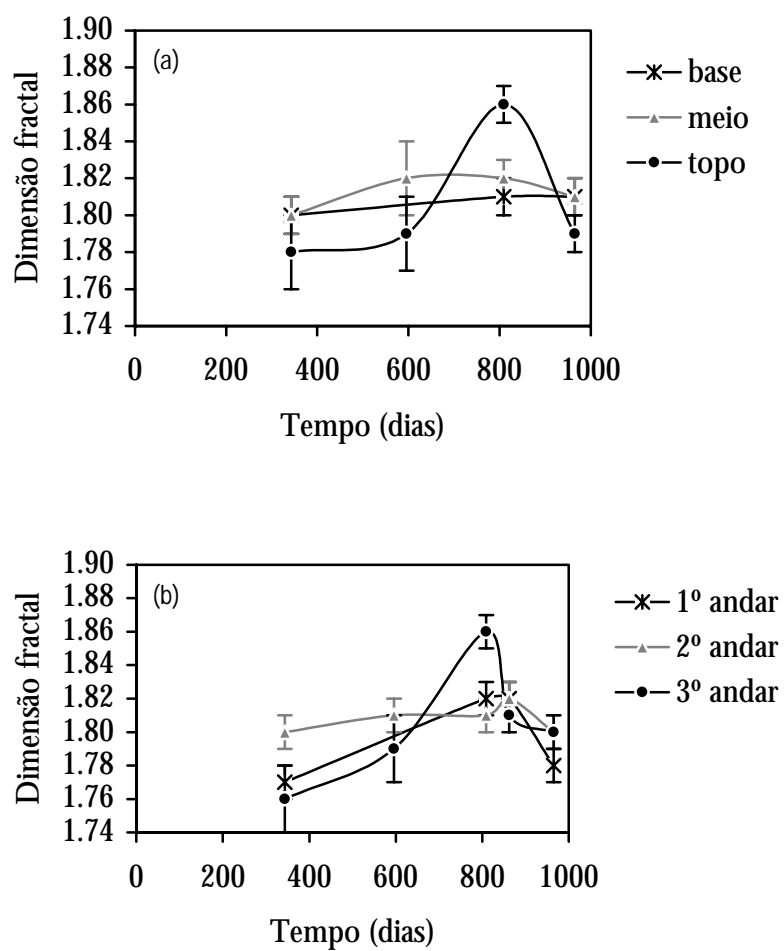


Figura 3.88 Variação ao longo do tempo da dimensão fractal dos agregados em cada secção de FAI (a) e de FAII (b).

3.5 Conclusões

A comparação do funcionamento de um digestor de leito fixo segmentado com um digestor de leito fixo de configuração convencional permitiu obter algumas conclusões que se passam a descrever.

Numa primeira fase que durou 343 dias não se adicionaram nutrientes e os digestores operaram de modo instável, mesmo para cargas orgânicas inferiores a 1.5 kg CQO/m³.dia. No digestor segmentado verificou-se que o 2º andar era o mais sensível à falta de nutrientes. Na configuração não segmentada aplicou-se temporariamente uma carga orgânica de 2.9 kg CQO/m³.dia, mas a eficiência decresceu continuamente até atingir mínimos de 56%.

Após a adição de nutrientes os digestores operaram de modo estável, com tempo de retenção hidráulico de 2 dias, concentração de substrato crescente entre 3 e 12 g CQO/L e com eficiências de remoção de CQO solúvel superiores a 97%. Nestas condições operatórias não se detectaram diferenças entre as duas configurações em termos de desempenho.

Os perfis de substrato ao longo da altura dos digestores revelaram que a CQO decrescia acentuadamente a seguir à entrada de cada digestor e de cada andar do digestor segmentado e, para a concentração mais baixa (3 g CQO/L) não se detectou a formação de AGV nos digestores. Com o aumento da carga orgânica aplicada, a base dos digestores tornou-se mais acidogénica, o que está de acordo com o aumento da actividade acidogénica em lactose aí verificado.

As actividades metanogénicas em acetato, H₂/CO₂, propionato e butirato e a actividade acidogénica em lactose foram medidas em três amostras em cada digestor (base, meio e topo) para as concentrações de substrato de 3 e de 9 g CQO/L. Verificou-se que a actividade acidogénica em lactose decrescia da base para o topo e que a actividade acetoclástica e hidrogenofílica aumentavam. A actividade sintrófica em propionato foi máxima na secção do meio em ambos os digestores. Esta distribuição foi semelhante para ambas as configurações embora no digestor segmentado a estratificação tenha sido mais

acentuada. Concluiu-se que não houve efeito da remoção de biogás na distribuição dos principais grupos tróficos do consórcio e que, mesmo numa configuração tradicional onde o efeito de mistura prevalece, a população microbiana se estratifica ao longo da altura do digestor.

Para a concentração de 3 g CQO/L o tamanho dos agregados foi uniforme ao longo da altura dos digestores e não houve nenhuma diferença significativa entre as duas configurações. Para a concentração de 9 g CQO/L, os agregados com maior tamanho (diâmetro equivalente de 2 a 2.3 mm) acumularam-se no topo de ambas as configurações, embora a estratificação de tamanho não tenha sido acentuada. No entanto, os agregados que possuíam maior velocidade de sedimentação eram os das secções do meio, onde se tinha registado a actividade máxima em propionato. Verificou-se haver uma relação crescente entre esta actividade e a velocidade de sedimentação das partículas, concluindo-se que a maior densidade dos agregados poderia favorecer a proximidade entre os grupos bacterianos envolvidos nas associações sintróficas, aumentando a sua actividade.

A dimensão fractal dos agregados foi máxima nas secções do meio dos digestores, indicando que os agregados que sedimentavam mais rapidamente eram mais esféricos e tinham uma superfície mais lisa do que os agregados mais leves.

O padrão de escoamento determinado a partir da técnica estímulo-resposta foi bem descrito por um modelo compartimental constituído basicamente por uma unidade de fluxo pistão à entrada em paralelo com uma zona morta, seguida de outra unidade de mistura perfeita. Para a concentração de entrada de 3 g CQO/L o digestor segmentado foi bem representado por uma série de 3 tanques agitados de igual volume, mas para a concentração de entrada de 9 g CQO/L, este digestor foi bem descrito pelo modelo compartimental com 65% de mistura perfeita. No digestor não segmentado, e nas duas condições operatórias referidas este modelo previa 78% de volume perfeitamente agitado.

Após a operação com tempo de retenção constante em 2 dias e concentração de substrato crescente entre 3 e 12 g CQO/L, fixou-se a concentração de entrada em 9000 mg CQO/L e diminuiu-se gradualmente o tempo de retenção hidráulico desde 2 dias até 10 horas.

No digestor segmentado a alimentação foi distribuída pelos vários andares, segundo um critério de carga máxima aplicada em cada andar. Enquanto que no 1º andar a carga máxima foi limitada pelos valores de pH à saída, no 2º andar a carga máxima foi limitada pelos valores de eficiência de remoção. Após detecção da carga orgânica limitante, esta foi reduzida, repondo-se o valor imediatamente inferior, mas que não provocava baixas de pH ou de eficiência nos andares. Seguindo esse critério distribuiu-se a carga orgânica pelos 3 andares do digestor segmentado, sendo 33% da carga total aplicada alimentada no 1º andar, 46% no 2º e 21% no 3º andar. O facto do 2º andar receber a maior parte da carga orgânica alimentada deveu-se ao facto de se ter verificado que este andar era capaz de maiores remoções de CQO do que os outros andares, suportando cargas aplicadas até 23 kg CQO/m³.dia, mantendo a eficiência de remoção em 80%.

Durante este período operatório também não se detectaram diferenças significativas entre o desempenho das duas configurações.

A caracterização biológica da biomassa permitiu concluir que a actividade acetoclástica continuou a ser máxima no topo dos digestores, embora fosse elevada em todas as secções. A actividade em H₂/CO₂ não mostrou uma tendência definida de estratificação ao longo da altura dos digestores e o máximo da actividade em propionato deslocou-se do meio para o topo em ambos os digestores, sendo mais elevada no digestor segmentado do que no não segmentado. Na configuração não segmentada a actividade acidogénica em lactose decresceu da base para o topo e no digestor segmentado apresentou um máximo no 2º andar, onde se alimentava a maior parte da carga orgânica aplicada no digestor.

Em determinadas condições operatórias (TRH=16 horas, alimentação dupla no digestor segmentado e única no digestor não segmentado), os agregados acumulados no topo de ambos digestores eram de grandes dimensões (diâmetro equivalente de 3.7 mm). Contudo, quando no digestor segmentado se retirou parte do caudal que estava a ser alimentado à entrada do 2º andar e se introduziu no 3º andar, as partículas nesse andar diminuíram acentuadamente de tamanho, passando para diâmetros equivalentes de 1.4 mm. Essa diminuição de tamanho acompanhou um aumento da velocidade de sedimentação e da rugosidade da superfície dos agregados que se supôs ter sido devida ao crescimento de bactérias acidogénicas, comprovado pelo aumento da actividade em lactose. A hipótese de

desintegração dos agregados devido à acumulação de biogás no seu interior pode também justificar a diminuição de tamanho e o aumento da velocidade de sedimentação observados.

As experiências de distribuição de tempos de residência realizadas quando o tempo de retenção hidráulico era de 10 horas permitiram concluir que, nessas condições, e após 880 dias de operação, o volume “morto” representava cerca de 60% do volume dos digestores.

A comparação da operação do digestor segmentado com alimentação distribuída com a operação com uma única alimentação, permitiu concluir que o digestor segmentado não alterou o seu desempenho. No entanto, a alteração do esquema de alimentação no digestor não segmentado, passando de única a distribuída, provocou uma diminuição da eficiência de 68 para 52%. No digestor segmentado verificou-se que o 2º andar era o menos eficiente.

A caracterização das fracções de biomassa acumulada nos digestores no final da operação permitiu concluir que na base de FAII e de FAI a biomassa retida na forma oclusa atingiu valores de 30 e 34 g SV/L de vazio da matriz, respectivamente, e que esses valores eram cerca de 18% inferiores no topo dos digestores. A biomassa aderida também se distribuiu uniformemente ao longo dos digestores variando entre 32 e 40 g SV/m² de suporte, o que em termos percentuais representou uma variação entre 21 e 25% da biomassa total retida.

Após a operação do digestor segmentado com uma alimentação na base, verificou-se que a actividade acetoclástica e hidrogenofílica se estratificaram ao longo do digestor, aumentando acentuadamente da base para o topo. A actividade acetoclástica no topo atingiu um valor 3.4 vezes superior à determinada na base e a actividade hidrogenofílica duplicou entre a base e o topo do digestor. A actividade acidogénica em lactose diminuiu da base para o topo, variando entre 14.7 e 2 mmoles lactose/gSV.dia. No último andar do digestor segmentado a actividade em propionato continuou a ser máxima.

O tamanho médio dos agregados microbianos foi aproximadamente uniforme em todas as secções de ambos os digestores, variando entre 1.4 e 2 mm. Contudo, a velocidade de sedimentação das partículas presentes no topo do digestor segmentado foi 1.7 vezes superior à registada para as partículas presentes nas restantes secções deste digestor.

Os esquemas de alimentação que se impuseram nos digestores conduziram à acumulação de agregados de aspecto indiferenciado, que se caracterizaram por uma rugosidade elevada, típica da biomassa floculenta.

Em termos gerais os resultados permitem concluir que para um substrato facilmente degradável não houve vantagem de utilizar um sistema segmentado em três andares, nem com uma alimentação única nem com a alimentação distribuída pelos vários andares. Nas condições operatórias testadas a similitude entre os resultados obtidos com a configuração tradicional e com a configuração segmentada não foi só a nível de desempenho mas também em termos da distribuição dos intermediários e da quantidade, actividade e características físicas dos agregados. A análise da variação destas propriedades com o tempo de operação em cada secção dos digestores, permitiu verificar que eram sensíveis às condições operatórias impostas. Além disso verificou-se que existiam relações entre a actividade biológica e as características físicas dos agregados.

Em termos de eficiência, a elevada sensibilidade do 2º andar às condições operatórias e a constatação de que é neste andar que se detectou em determinadas condições operatórias a maior actividade sintrófica, leva a supôr que esta população será mais sensível às variações nas condições operatórias.

As dificuldades que surgiram ao longo deste trabalho na amostragem da biomassa dos digestores, conduziram ao desenvolvimento de uma metodologia destinada ao estudo de interacções entre a biomassa e o suporte neste tipo de sistemas de leito fixo. Esta metodologia será apresentada no **Capítulo 4**.

4. Interacções entre a biomassa e o suporte em filtros anaeróbios

Sumário

O comportamento da biomassa num filtro anaeróbio nomeadamente as interacções com o meio de enchimento e o crescimento e desenvolvimento do consórcio microbiano, são fenómenos fortemente dependentes do tipo de efluente utilizado, do meio de enchimento e das condições operatórias. Neste capítulo é apresentada uma metodologia que permite estudar interacções entre a biomassa e o suporte em filtros anaeróbios de fluxo ascendente. O conceito baseia-se na colocação de vários mini-biorreactores em paralelo na secção central do digestor com possibilidade de serem retirados simultânea ou periodicamente, de acordo com os objectivos do estudo. São apresentados dois exemplos de aplicação: I) comparação da capacidade de colonização de anéis de Raschig de três materiais (Vidro, vidro acrílico e policloreto de vinil (PVC)) com três tamanhos após 115 dias de operação; II) evolução da quantidade e da actividade do consórcio desenvolvido durante uma operação de 246 dias. Em ambas as experiências utilizou-se um substrato lácteo sintético. Concluiu-se na primeira experiência que a biomassa oclusa se encontrava mais concentrada nos menores tamanhos de suporte e que a biomassa aderida era superior nos tamanhos maiores. Uma maior velocidade intersticial no suporte pareceu induzir uma maior concentração de biomassa oclusa. A fracção de biomassa aderida relativamente à biomassa total retida foi, em média, de 8%. No vidro que era a superfície mais lisa e mais hidrofílica, formou-se um biofilme menos espesso do que nas outras superfícies, tendo-se observado por microscopia electrónica de varrimento que bactérias semelhantes ao género *Methanospirillum* eram abundantes nesta superfície. Na experiência II verificou-se que a fracção de biomassa aderida aumentou linearmente com o tempo de operação, atingindo um máximo de 40%. O consórcio desenvolvido revelou-se estável durante a operação, excepto no caso das bactérias metanogénicas acetoclásticas cuja actividade atingiu um máximo de 621.4 ± 106.6 mL CH₄@PTN/gVS no 162º dia de operação tendo decrescido em seguida.

Índice

4.1	INTRODUÇÃO	235
4.2	OBJECTIVOS	238
4.3	MATERIAIS E MÉTODOS	239
4.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	246
4.5	CONCLUSÕES	258

4.1 Introdução

Desde que assegurado o contacto entre o efluente e a biomassa, a capacidade de tratamento de qualquer processo biológico depende da quantidade e da actividade específica da biomassa presente. A existência de uma população com elevada actividade e equilibrada em termos de composição microbiana permite minimizar os riscos de instabilidade devida a choques hidráulicos, orgânicos, de temperatura ou de tóxicos (MORGAN *et al.*, 1991).

A colonização do suporte num filtro anaeróbio processa-se gradualmente após a inoculação. O crescimento microbiano na matriz depende do tipo de suporte, das condições operatórias e da composição do efluente.

Os estudos comparativos de diferentes suportes para imobilização de biomassa em filtros anaeróbios têm sido realizados operando cada digestor com um suporte diferente (REYNOLDS, 1986, SONG E YOUNG, 1986) ou em ensaios simultâneos em reactor fechado (BONASTRE E PARIS, 1988). Embora a primeira metodologia forneça dados directamente extrapoláveis, se o objectivo for comparar um grande número de materiais de suporte, o trabalho laboratorial envolvido é muito considerável, principalmente se foram avaliadas operações de longo termo. Por outro lado, a comparação em ensaios “*batch*” não considera as condições operatórias prevalentes num reactor real. Além disso, em ambas as metodologias pode ser considerável a variabilidade de condições operatórias entre os diferentes ensaios.

O estudo dos filtros anaeróbios tem sido muito limitado pela dificuldade em conhecer as características e a evolução da biomassa presente. Normalmente caracteriza-se a biomassa no final da operação tal como realizado por SOTO *et al.*, (1992) que caracterizaram e compararam, no fim da operação, a biomassa acumulada num filtro anaeróbio termofílico com a de um filtro anaeróbio mesofílico. Este procedimento é o mais comum dada a dificuldade de realizar estudos periódicos da biomassa, sem perturbar o funcionamento do digestor.

HANAKI *et al.*, (1994) operaram filtros anaeróbios em paralelo e em idênticas condições operatórias e procederam à remoção e caracterização das fracções de biomassa presentes ao fim de diferentes períodos de tempo, tendo operado um total de 25 digestores com

diferentes tipos de substratos e em diferentes condições de tempo de retenção. Concluíram que mesmo em condições pseudo-estacionárias relativamente à produção de metano e à qualidade do efluente tratado, a biomassa apresentava um comportamento não estacionário.

KENNEDY E DROSTE (1986) também caracterizaram o biofilme formado num filtro anaeróbio de fluxo descendente, removendo periodicamente um módulo vertical constituinte da matriz de suporte.

ANDERSON *et al.* (1994) estudaram a evolução da composição do consórcio anaeróbio durante o arranque de um processo em duas fases que incluía um filtro anaeróbio. Utilizaram como metodologia a contagem celular por observação microscópica e a técnica NMP (número mais provável) para contar o número de bactérias metanogénicas viáveis. Observaram que no filtro anaeróbio, a população metanogénica variava entre 1 e 9% da população bacteriana total e, embora tenham obtido informação qualitativa e quantitativa sobre a composição e evolução do consórcio, não detectaram estratificação no filtro anaeróbio, nem obtiveram dados relativamente à distribuição da biomassa no suporte.

Também MORGAN *et al.* (1991) utilizaram as mesmas técnicas para avaliar o efeito da configuração do reator no desenvolvimento do consórcio microbiano e concluíram que as diferenças obtidas entre diferentes tipos de digestores se situavam dentro dos limites de confiança associados aos métodos.

LIU *et al.* (1991) propuseram e validaram um modelo que simula o comportamento de um filtro anaeróbio. Segundo esse modelo, a biomassa aderida aumenta com o aumento da carga orgânica até um determinado valor de espessura. Aumentos posteriores da carga orgânica, provocam a acumulação da biomassa na forma oclusa o que deteriora a qualidade do efluente final. JIMENO *et al.* (1990) desenvolveram um digestor de filme fixo para estudar o desenvolvimento de biofilme num filtro percolador anaeróbio parcialmente submerso. A metodologia consistiu em acoplar, na entrada e na saída do digestor pequenos tubos paralelos que eram removidos para analisar o biofilme.

As interações entre a biomassa e o suporte em filtros anaeróbios são altamente dependentes do tipo de substrato e do tipo de suporte utilizado, assim como das condições operatórias aplicadas. As previsões do comportamento, baseadas em estudos prévios podem

falhar completamente caso as condições operatórias, o substrato e o tipo de suporte sejam diferentes. No presente Capítulo apresenta-se uma metodologia que permite estudar interacções biomassa-suporte em filtros anaeróbios, apresentando-se dados que comprovam a sua utilidade na selecção de suportes e na avaliação, em termos evolutivos das características da biomassa desenvolvida.

4.2 Objectivos

O objectivo do presente trabalho foi desenvolver um digestor anaeróbio de leito fixo que permite estudar interacções entre a biomassa e o suporte e testar essa metodologia com duas aplicações distintas:

Numa primeira aplicação (experiência I) o objectivo foi comparar a capacidade de retenção de biomassa de três materiais (anéis de *Raschig* de vidro, vidro acrílico e PVC) com três tamanhos em termos da distribuição entre biomassa aderida e oclusa. Numa segunda experiência (experiência II) o objectivo foi estudar evolutivamente a colonização do suporte durante o início de operação, avaliando a distribuição da biomassa no suporte, entre as formas aderida e oclusa, e a actividade de diferentes grupos tróficos do consórcio microbiano anaeróbio estabelecido.

4.3 Materiais e Métodos

4.3.1 Instalação experimental

O reactor anaeróbio de leito fixo construiu-se a partir de um tanque cilíndrico em PVC com um diâmetro interno de 48 cm e um volume útil de 86 Litros. A uma altura de 10 cm da base fixou-se uma placa perfurada, atravessada no centro pelo veio de um agitador. Esta placa permitiu suportar o material de suporte que se dividiu em mini-biorreactores colocados em paralelo na secção central. Colocou-se na parte superior do leito uma rede larga com um espaçamento de 1cm, que ajudou a suportar o conjunto dos tubos. Um agitador tipo hélice, colocado a 5 cm do fundo, promoveu a distribuição da alimentação após a entrada na zona central da base do digestor. Em ambas as experiências utilizaram-se anéis de *Raschig* como suporte. Na Figura 4.1 apresenta-se um esquema do digestor.

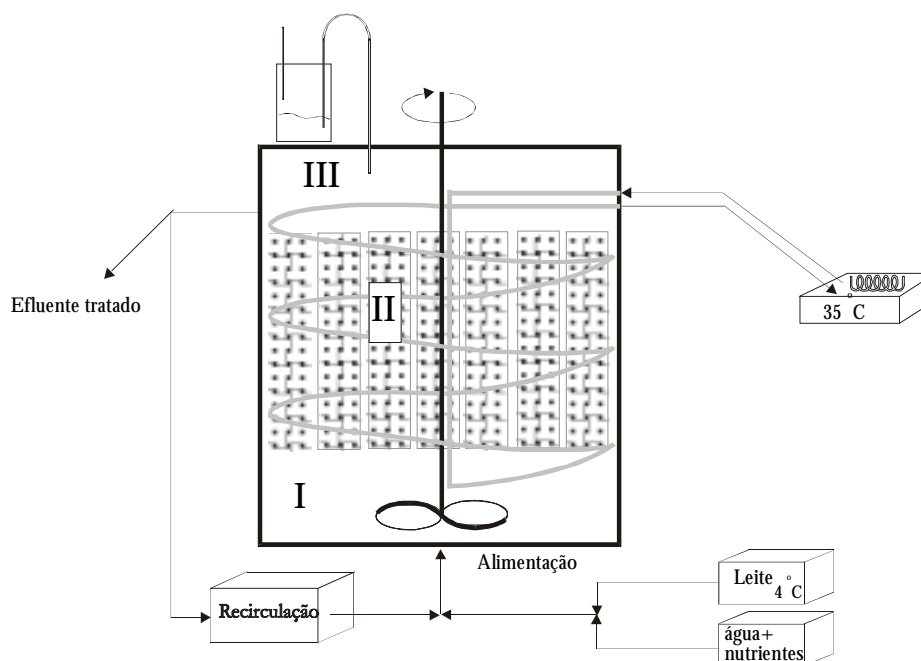


Figura 4.1 Representação esquemática da instalação experimental.

Podem identificar-se três zonas distintas no biorreator:

Zona I: É a parte inferior do reactor, por onde entra a alimentação. A altura desta zona, 10 cm, foi a mínima possível que permitiu a colocação do agitador tipo hélice. Não contem suporte, embora parte significativa da biomassa possa ficar retida nesta secção.

Zona II: É a secção central do biorreactor. É constituída por mini-biorreactores em paralelo, mas o arranjo destes depende do objectivo da experiência. No presente caso a configuração desta zona foi diferente para a experiência de comparação dos materiais de suporte (experiência I) e para o estudo do desenvolvimento da biomassa (experiência II). Ambas as configurações são descritas detalhadamente nos **sub-Capítulos 4.3.1.1 e 4.3.1.2** deste capítulo.

Zona III: Representa a parte do digestor acima do suporte. O volume total desta secção é de 18 Litros e nela situam-se a entrada e saída da serpentina de aquecimento e a saída do efluente tratado. Verificou-se que o biogás não se acumula nesta secção e que se escapa pelo rolamento colocado na tampa do digestor para permitir o movimento giratório do veio do agitador.

4.3.1.1 Suportes e configuração da matriz na experiência I

Nesta experiência compararam-se três materiais (vidro (V), vidro acrílico (VA) e polícloreto de vinil (PVC)) e três tamanhos de anéis de *Raschig*. Como o objectivo foi essencialmente testar a metodologia, a escolha destes materiais foi determinada pela disponibilidade comercial de tamanhos adequados e semelhantes entre os vários materiais. Este aspecto é particularmente válido para o caso do vidro que tem uma aplicação prática limitada em filtros anaeróbios. Com o objectivo de minimizar o espaço, construíram-se mini-biorreactores com diâmetros proporcionais aos diâmetros do suporte. Assim, os suportes mais pequenos foram colocados em mini-biorreactores mais pequenos, mantendo, contudo, a mesma configuração da matriz (Tabela 4.1). No caso do PVC os diâmetros comercialmente disponíveis eram um pouco maiores do que os dos restantes materiais.

A conjugação materiais/tamanhos resultou em 9 combinações. De modo a ter algum significado estatístico realizaram-se quatro réplicas de cada, e as restrições espaciais conduziram à configuração do leito representada na Figura 4.2.

Tabela 4.1 Tamanho dos suportes e dos mini-biorreactores utilizados na experiência I.

	diâmetro menor (cm)	diâmetro médio (cm)	diâmetro maior (cm)
mini-biorreactor	2.5	4.4	6.2
V	0.83	1.20	2.04
VA	0.81	1.21	2.00
PVC	1.20	1.60	2.00

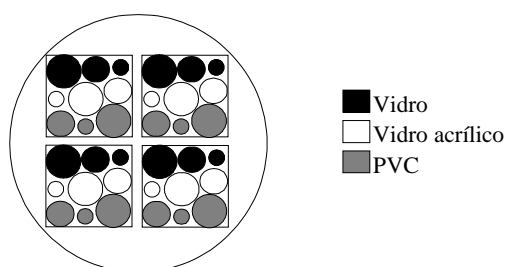


Figura 4.2 Vista da secção do biorreactor na experiência I.

A altura do leito nesta experiência foi de 15 cm e o volume total de 27.1 Litros. Na Tabela 4.2 estão registados os valores médios (das quatro réplicas) da porosidade do leito para cada material e para cada tamanho de suporte.

Tabela 4.2 Porosidade média das matrizes de cada material e de cada tamanho de suporte.

	porosidade média		
	diâmetro menor	diâmetro médio	diâmetro maior
V	0.77±0.02	0.83±0.01	0.89±0.01
VA	0.69±0.02	0.83±0.01	0.80±0.01
PVC	0.87±0.02	0.86±0.01	0.85±0.01

Nesta experiência, o biorreactor foi aberto no final da operação e as fracções de biomassa aderida e oclusa foram separadas e quantificadas individualmente para cada um dos 36 mini-biorreactores.

4.3.1.2 Suportes e configuração da matriz na experiência II

Esta experiência foi programada para seguir evolutivamente o desenvolvimento da biomassa no suporte durante a operação em contínuo do biorreactor. A secção de leito fixo foi rearranjada para cumprir este objectivo e consistiu num conjunto de 27 mini-biorreactores similares, colocados em paralelo. Na Tabela 4.3 estão resumidas as características do suporte e do leito nesta experiência.

Tabela 4.3 Dimensões e características do suporte e do leito.

	unidade de suporte	mini-biorreactor	leito
número	89/mini-biorreactor	27	-
altura (cm)	2.10	25	25
diâmetro interno (cm)	1.97	7.1	-
diâmetro externo (cm)	2.10	7.5	-
porosidade	-	-	0.92
área interfacial, (m ² /m ³)	-	-	230

O volume total de leito fixo nesta experiência foi de 40 Litros. Na Figura 4.3 está representada uma vista da secção do biorreactor.

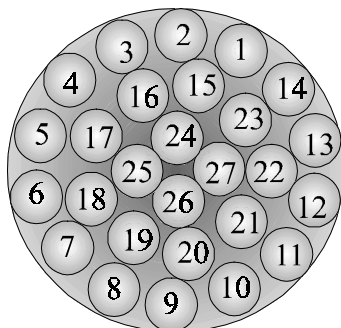


Figura 4.3 Vista da secção do biorreactor na experiência II.

4.3.2 Procedimento utilizado na abertura do biorreactor

Na experiência I, o biorreactor foi aberto apenas no final da operação, pelo que não houve cuidados especiais na manutenção das condições anaeróbias no mesmo. Na experiência II o biorreactor foi aberto quatro vezes e três dos 27 mini-biorreactores foram seleccionados aleatoriamente e substituídos por mini-biorreactores novos, sem biomassa. Assim, minimizaram-se as perturbações, mantendo o tipo de escoamento no reactor. Como cada mini-biorreactor era numerado tal como indicado na Figura 4.3, cada conjunto que era

seleccionado, não era tido em conta no sorteio seguinte. Imediatamente após a remoção dos tubos do meio líquido do digestor, os mesmos eram colocados num recipiente para recolher alguma biomassa oclusa que começava a desprender-se do suporte. A biomassa dos três mini-biorreactores retirados era misturada e analisada conjuntamente. Esta operação de abertura e recolha da biomassa foi feita na presença de azoto e antes de fechar o digestor injectou-se uma mistura de N_2/CO_2 (80/20) na zona III do digestor.

4.3.3 Substrato e Inóculo

O substrato consistiu num efluente lácteo sintético, obtido por diluição de leite magro com água da rede. Foi adicionado bicarbonato de sódio na concentração de 5 g/L para manter a alcalinidade em valores adequados (2500-5000 mgCaCO₃/L). Na experiência I não foram adicionados outros nutrientes mas na experiência II adicionaram-se macro e micronutrientes de acordo com a seguinte composição:

Macronutrientes - MgSO₄.7H₂O: 30.2 g/L; KH₂PO₄: 28.3 g/L KCl: 45 g/L. Esta solução foi adicionada numa quantidade de 0.6 mL por grama de CQO alimentado.

Micronutrientes - FeCl₂.6H₂O: 2 g/L; H₃BO₃: 0.05 g/L; ZnCl₂: 0.05 g/L; CuCl₂.2H₂O: 0.038 g/L; MnCl₂.4H₂O: 0.5 g/L; (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O: 0.05 g/L; AlCl₃.6H₂O: 0.09 g/L; CoCl₂.6H₂O: 2 g/L; NiCl₂.6H₂O: 0.092 g/L; Na₂SeO₃.5H₂O: 0.164 g/L; EDTA: 1g/L, Resazurina: 0.2 g/L; HCl 37%: 1 mL/L. A composição desta solução baseou-se no trabalho de ZEHNDER *et al.* (1980). Esta solução adicionou-se numa quantidade fixa de 1ml por litro de alimentação.

O inóculo foi obtido de um digestor anaeróbio de tratamento de lamas integrado na estação de tratamento de águas residuais de Cambados, Maia. Na experiência I adicionaram-se 15 Litros com uma concentração de 19 g de sólidos voláteis por litro. Na experiência II adicionaram-se 11 Litros com 25.7 g de sólidos voláteis (SV) por litro. Em ambos os casos, removeram-se o sólidos mais grosseiros fazendo passar as lamas por um crivo com 0.7 mm de abertura de malha.

4.3.4 Controlo analítico de rotina

Em ambas as experiências seguiu-se a operação dos reactores pela análise periódica (três a quatro vezes por semana) da Carência Química de Oxigénio (CQO) nas correntes de entrada e saída, dos Ácidos Gordos Voláteis (AGV) na corrente de saída e dos caudais de alimentação. Os métodos analíticos utilizados foram descritos nos **sub-Capítulos 3.3.3.1, 3.3.3.2, 3.3.3.3 e 3.3.3.4**, páginas **110 a 112** desta dissertação.

4.3.5 Caracterização da biomassa

4.3.5.1 Recolha, separação e quantificação das fracções de biomassa

Em ambas as experiências a biomassa oclusa foi considerada a fracção que se desprendia do suporte quando este era espalhado num banho de água destilada agitado manualmente com movimentos giratórios de sentido alternado durante 1 minuto. Após separação e centrifugação, o volume total e o conteúdo em sólidos voláteis foi determinado. Na experiência I este procedimento foi repetido para cada um dos 36 mini-biorreactores e não houve cuidados especiais com a manutenção da actividade da biomassa pois esta só foi utilizada para determinação de sólidos voláteis. Na experiência II, os três tubos recolhidos foram analisados conjuntamente sendo o conteúdo dos três mini-reactores misturado no mesmo recipiente. Este procedimento fez-se na presença de N₂/CO₂ (80:20), evitando o contacto da biomassa com o ar, dado que seria posteriormente utilizada para efectuar testes de actividade metanogénica. Após decantação e centrifugação a 6000 rpm, durante 10 minutos, a biomassa foi ressuspensa em tampão anaeróbio e foram medidos o volume total e a concentração de sólidos voláteis. Após armazenamento a 4°C e com a maior brevidade possível, foram iniciados os testes de actividade metanogénica específica.

A fracção aderida foi removida do suporte por sonicação num banho (*Sonicor SC 52*), durante dez minutos. Na experiência II, este procedimento foi precedido por uma remoção com NaOH 0.1 N, durante 12 horas a 37 °C e com uma agitação de 100 rpm, tal como proposto por DONLON (1992). O volume final e o conteúdo em sólidos voláteis foi determinado.

4.3.5.2 Testes de actividade metanogénica

A actividade metanogénica específica da biomassa oclusa desenvolvida durante a experiência II foi determinada de acordo com o método descrito no **sub-Capítulo 3.3.4.2**, página 114.

4.3.5.3 Observações microscópicas

Utilizou-se um microscópio electrónico de varrimento (*Leica, Cambridge, S360*) para observar a biomassa que aderiu ao suporte durante a experiência I. As amostras foram fixadas com uma solução de glutaraldeído 3%(v/v) em tampão cacodilato pH 7.2. Seguidamente foram desidratadas por lavagem com soluções de etanol de concentração crescente (10, 25, 50, 75, 90 e 100%) e armazenadas num exsiccador até ao momento de observação.

4.3.6 Condições operatórias

Na experiência I, a concentração à entrada aumentou de 3000 para 6000 mg CQO/L e o tempo de retenção hidráulico (TRH) foi fixado em 1.3 dias (baseado no volume total da secção de leito fixo). Na experiência II, a concentração à entrada aumentou de 3000 para 12000 mg CQO/L e, após a fase de arranque o tempo de retenção variou entre 0.92 e 1.4 dias.

Devido à baixa razão altura/diâmetro do digestor, foi aplicada uma recirculação em ambas as experiências para aumentar a velocidade superficial, que se manteve em 0.27 m/dia durante a experiência I e em 0.43 m/dia durante a experiência II.

4.4 Resultados e discussão

Na Tabela 4.4 e na Tabela 4.5 estão representados os valores médios de estado pseudo-estacionário relativos à operação durante as experiências I e II respectivamente.

Tabela 4.4 Condições operatórias e desempenho do biorreactor durante a experiência I
(\pm intervalo com 95% de confiança).

Tempo (dias)	Tempo de retenção (*) (dias)	CQO à entrada (mg/L)	Carga orgânica aplicada(*) (kg CQO/m ³ .dia)	Eficiência de remoção (%)
0-48	1.4 \pm 0.2	2723 \pm 331	2.4 \pm 0.8	61 \pm 9
49-115	1.3 \pm 0.1	5619 \pm 274	4.3 \pm 0.5	73 \pm 4

Tabela 4.5 Condições operatórias e desempenho do bioreactor durante a experiência II
(\pm intervalo com 95% de confiança).

Tempo (dias)	Tempo de retenção (*) (dias)	CQO à entrada (mg/L)	Carga orgânica aplicada (*) (kg CQO/m ³ .dia)	Eficiência de remoção (%)
0-29	1.4 \pm 0.1	3043 \pm 38	2.2 \pm 0.1	92 \pm 1
29-90	0.9 \pm 0.1	3043 \pm 38	3.3 \pm 0.1	94 \pm 1
90-114	0.9 \pm 0.1	5899 \pm 56	6.5 \pm 0.1	77 \pm 3
114-132	1.4 \pm 0.1	5899 \pm 56	4.3 \pm 0.1	93 \pm 2
132-162	1.4 \pm 0.1	8685 \pm 82	6.3 \pm 0.1	90 \pm 1
162-246	1.4 \pm 0.1	12099 \pm 72	8.7 \pm 0.2	86 \pm 1

(*) com base no volume de leito fixo do digestor

Para as mesmas condições operatórias, verificou-se que, durante a experiência II, a eficiência de remoção de CQO solúvel foi cerca de 20 a 30% superior à obtida durante a experiência I, o que se atribuiu à diferença na composição da alimentação, nomeadamente a presença de micronutrintes na experiência II. Nesta experiência, entre os dias 90 e 114, foi observada uma tendência decrescente na eficiência, atingindo um valor médio de estado pseudo estacionário de 77% durante esse período (Tabela 4.5). De modo a aumentar a eficiência e estabilizar o processo, aumentou-se o tempo de retenção de 0.92 para 1.4 dias. Na Figura 4.4 estão representados os dados operatórios ao longo do tempo de operação da experiência II. As linhas a tracejado verticais assinalam os dias em que se abriu o biorreactor para remover biomassa.

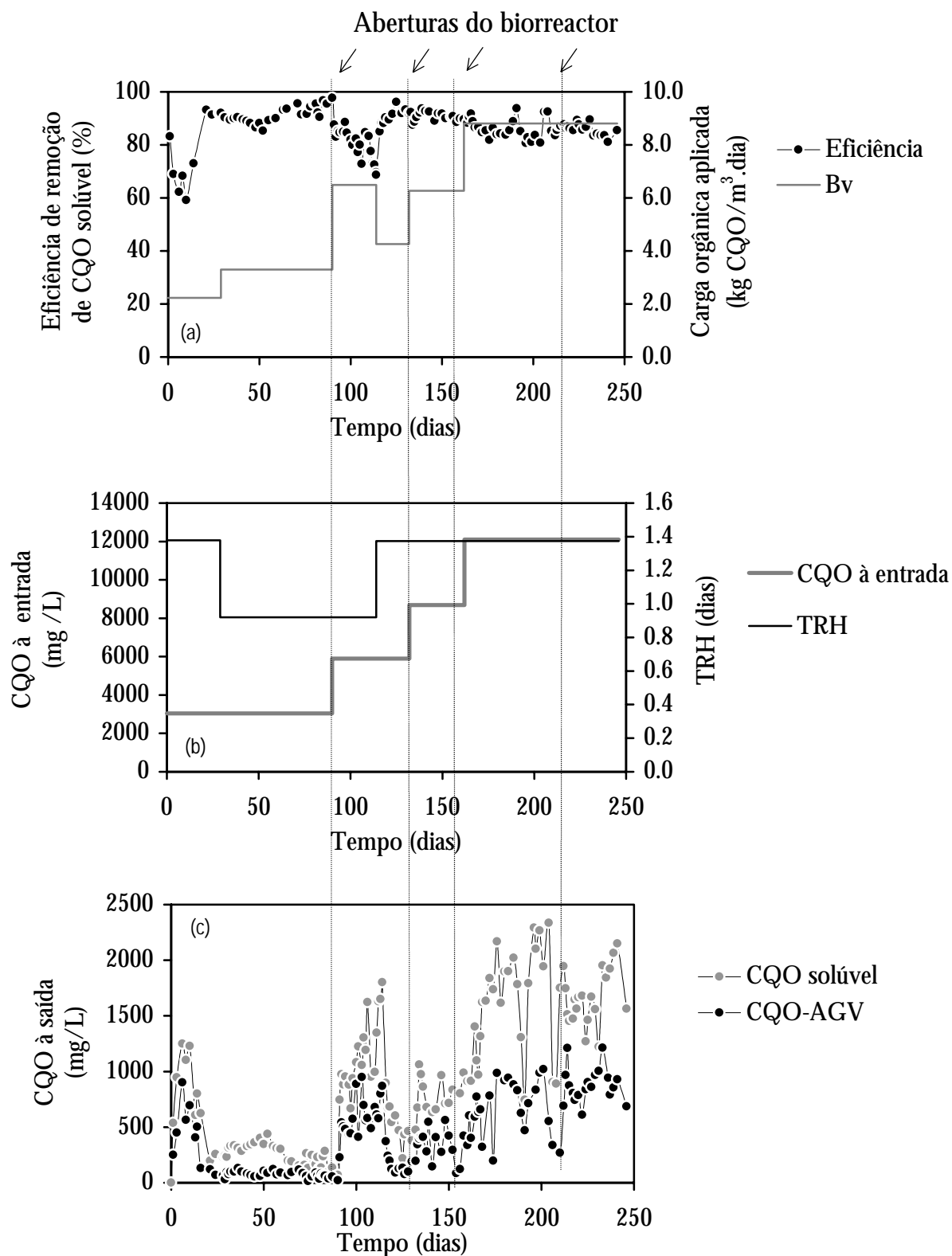


Figura 4.4 Dados operatórios e resultados de exploração do digestor proposto para estudos de biomassa, durante a experiência II. Carga orgânica aplicada e eficiência de remoção (a), concentração à entrada e tempo de retenção hidráulico (b) e CQO solúvel e CQO dos ácidos voláteis na corrente de saída (c).

Pode observar-se que não houve alterações significativas na estabilidade do processo, mesmo considerando que a carga orgânica foi aumentada após esses dias.

4.4.1 Caracterização da biomassa na experiência I

Na experiência I, após 115 dias de operação, o biorreactor foi aberto, todos os mini-biorreactores foram removidos e as fracções de biomassa caracterizadas. Os resultados foram expressos em termos de biomassa total acumulada ($\text{gSV}/\text{L}_{\text{biorreactor}}$), biomassa oclusa ($\text{gSV}/\text{L}_{\text{de vazio da matriz}}$) e biomassa aderida ($\text{gSV}/\text{m}^2_{\text{de suporte}}$). A fracção entre a biomassa retida por adesão e por oclusão foi calculada e expressa em percentagem da biomassa total acumulada. Cada valor representa uma média das quatro réplicas e são apresentados os intervalos de confiança (95%) associados.

4.4.1.1 Distribuição da biomassa no suporte na experiência I

Na Figura 4.5 está representada a biomassa total retida nos suportes.

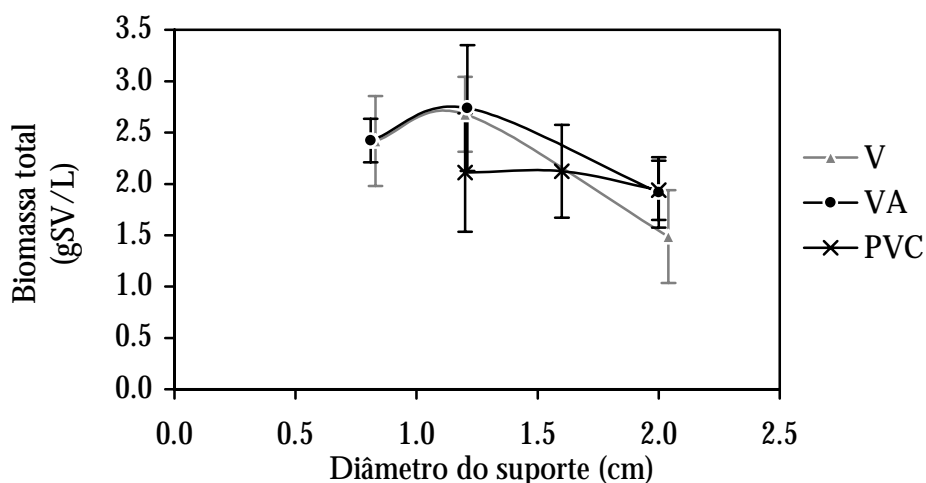


Figura 4.5 Efeito do tipo de material e do tamanho de suporte na concentração de biomassa total.

Observou-se que a biomassa total acumulada apresentou, para todos os materiais testados, um máximo para os tamanhos de suporte intermédios. Este facto é consequência de se ter verificado que, com o aumento do tamanho de suporte, a biomassa oclusa diminuía e que a biomassa aderida aumentava (Figura 4.6 e Figura 4.7).

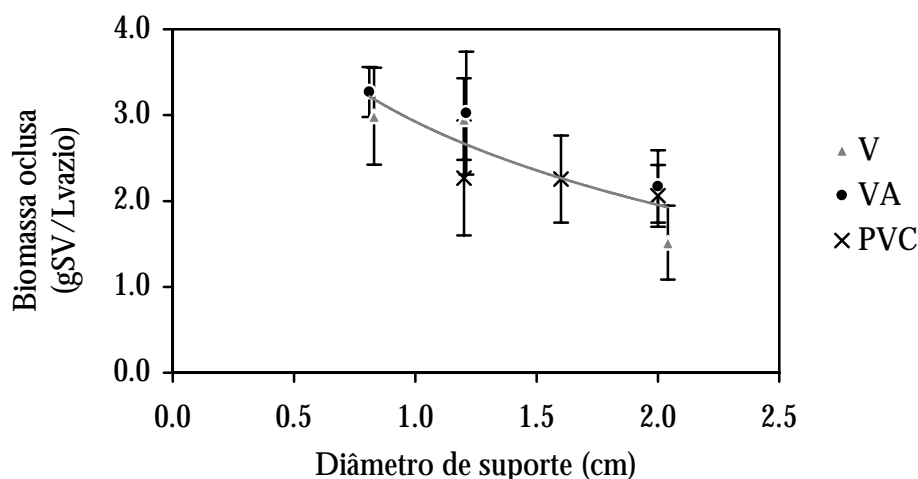


Figura 4.6 Efeito do tipo de material e do tamanho de suporte na concentração de biomassa oclusa.

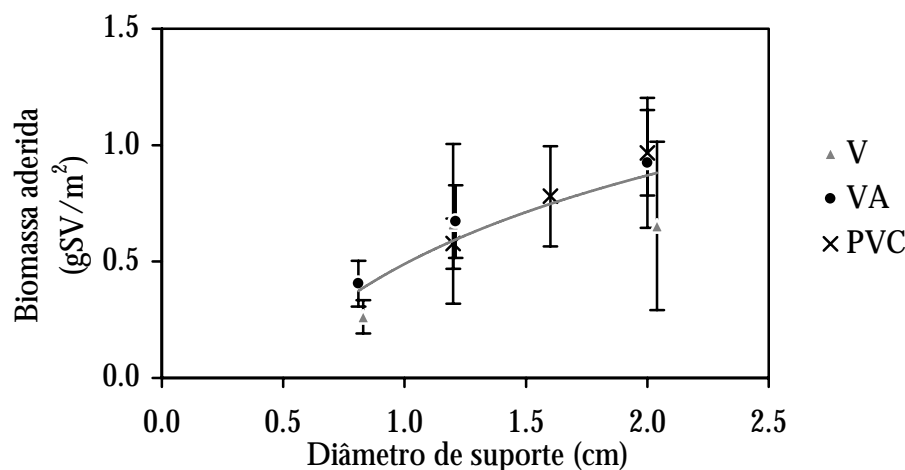


Figura 4.7 Efeito do tipo de material e do tamanho de suporte na concentração de biomassa aderida.

A fracção de biomassa aderida foi mais baixa para o vidro (valor médio de 6.3%) do que para os restantes materiais (8.2 e 8.6% respectivamente para o vidro acrílico e para o PVC), embora esteja associado aos valores um largo intervalo de confiança (Figura 4.8). Assim, nas condições experimentais do presente trabalho e para os suportes testados, constatou-se a preponderância da imobilização da biomassa na forma oclusa (em média 92% da biomassa total acumulada), tal como referido na literatura em operações com outros suportes e noutras condições experimentais (DAHAB E YOUNG, 1982, REYNOLDS, 1986).

A fracção de biomassa aderida aumentou com o aumento do tamanho de suporte.

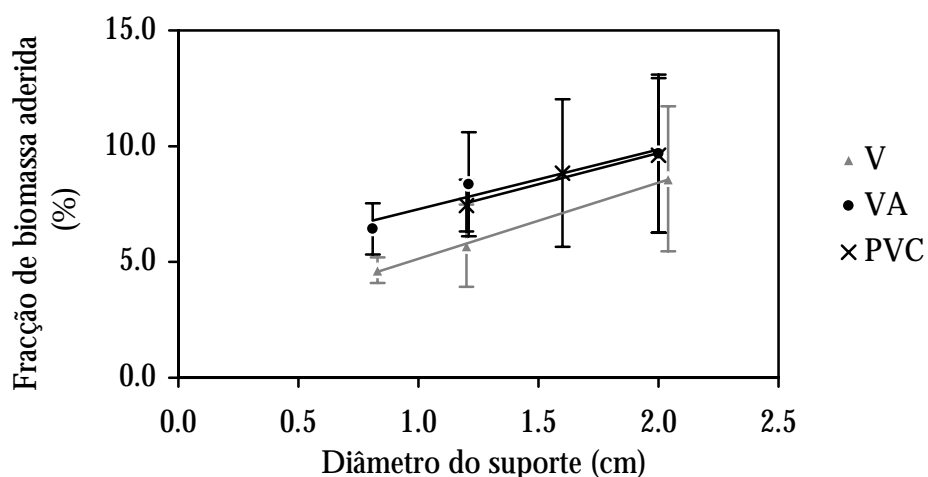


Figura 4.8 Efeito do tipo de material e do tamanho de suporte na fracção de biomassa aderida.

O efeito do tamanho não deve ser interpretado independentemente do efeito da porosidade do leito (Tabela 4.2). Admitindo a mesma velocidade superficial em toda a secção do reactor, pode considerar-se que as diferentes porosidades do leito podem ter induzido diferentes velocidades intersticiais através dos mini-bioreactores. A hipótese de as diferentes porosidades e diferentes concentrações de biomassa induzirem diferentes velocidades superficiais, não foi considerada.

Na Figura 4.9 (a) e (b) pode observar-se o efeito da velocidade intersticial na concentração de biomassa oclusa e aderida, respectivamente. Verifica-se uma clara tendência de aumento da concentração de biomassa oclusa com o aumento da velocidade intersticial, ou seja uma maior velocidade intersticial conduziu à acumulação de uma biomassa oclusa mais compacta e, por comparação com a Figura 4.6, isso sucedeu para os menores tamanhos de suporte, embora não seja possível avaliar se o efeito dominante foi a tamanho de suporte ou a velocidade intersticial.

Este facto pode ser relacionado com o observado por VIEIRA *et al.* (1994) que estudaram o efeito da velocidade do líquido na formação de biofilmes, tendo concluído que o aumento de velocidade induzia a formação de biofilmes mais compactos. No entanto, o paralelismo entre um biofilme (que pressupõe uma superfície para adesão), e biomassa dispersa ou floculenta deve ser reservado. Além disso essa hipótese não foi observada para a biomassa

aderida. De facto, observando a Figura 4.9 (b) verifica-se que não houve uma tendência clara entre a concentração de biomassa aderida e a velocidade intersticial, embora tenham sido obtidas menores concentrações nas condições de maior velocidade intersticial.

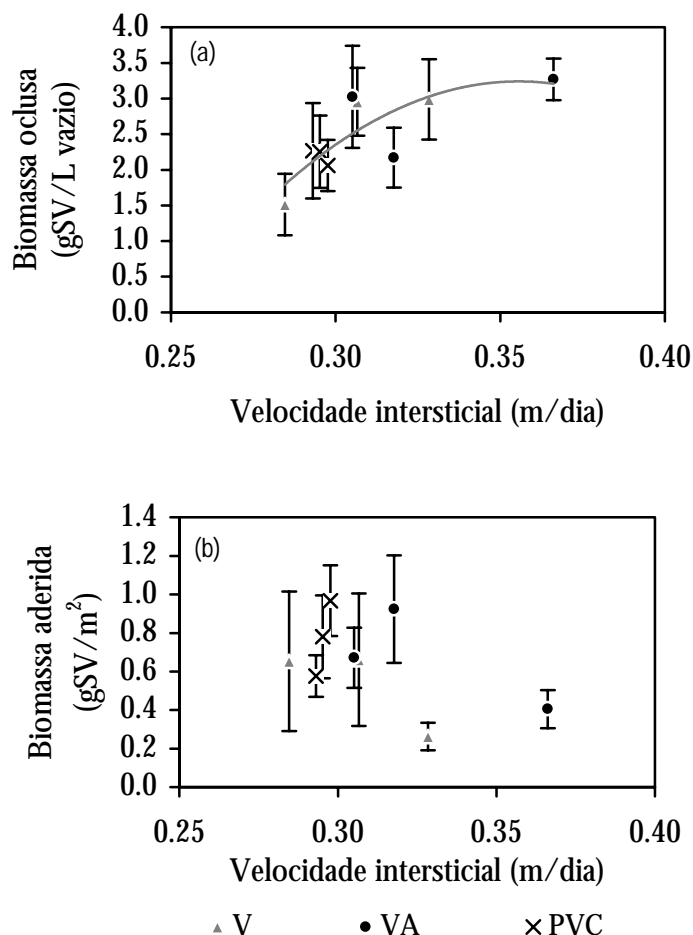


Figura 4.9 Efeito da velocidade intersticial na concentração de biomassa oclusa (a) e de biomassa aderida(b).

4.4.1.2 Microscopia electrónica

Foram obtidas fotografias da biomassa aderida num microscópio electrónico de varrimento. Na Figura 4.10 comparam-se as superfícies dos três materiais limpas e colonizadas. É evidente que o vidro é a superfície mais lisa e que o PVC apresenta alguma rugosidade (Figura 4.10 (d) e (f)). A rugosidade da superfície é considerada um factor importante no desenvolvimento de biofilmes (FOX *et al.*, 1990, WILKIE E COLLERAN, 1984).

Verificou-se que o vidro, a superfície mais hidrofílica testada (SOUSA *et al.*, 1997), foi predominantemente colonizado por bactérias semelhantes ao género *Methanospirillum*

enquanto que no vidro acrílico e no PVC surgiram filamentos semelhantes a *Methanosaeta* (ex- *Methanothrix*) (Figura 4.10 (a) a (c)). Este facto está de acordo com o observado por VERRIER *et al.* (1988), que estudaram a influência da hidrofobicidade da superfície, na adesão de culturas puras de bactérias metanogénicas, tendo concluído que a então designada *Methanothrix soehngenii* prefere superfícies hidrofóbicas, enquanto que *Methanospirillum hungatii* adere preferencialmente a superfícies hidrofílicas.

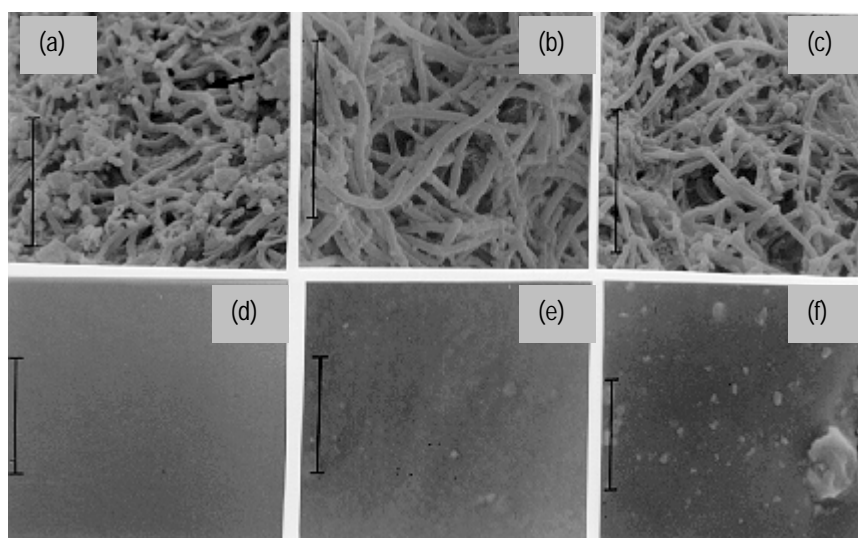


Figura 4.10 Fotografias obtidas num microscópio electrónico de varrimento. Superfícies colonizadas de vidro (a), vidro acrílico (b) e PVC (c). Superfícies limpas de vidro (d), vidro acrílico (e) e PVC (f). Em todas as fotografias a barra representa 10 μm .

4.4.2 Caracterização da biomassa na experiência II

Durante a experiência II a biomassa foi caracterizada após quatro períodos de operação, nos dias 90, 132, 162 e 212, correspondentes a cargas orgânicas aplicadas de 3.3, 4.3, 6.3 e 8.7 kg CQO/ m^3 .dia.

4.4.2.1 Distribuição da biomassa no suporte durante a experiência II

Os valores obtidos para a distribuição da biomassa estão apresentados na Tabela 4.6.

Tabela 4.6 Distribuição da biomassa no suporte durante a experiência II.

dia	biomassa aderida (gSV/m ²)	biomassa oclusa (gSV/L vazio)	biomassa total (gSV/L reactor)
90	0.5±0.1	0.6±0.1	0.4±0.1
132	1.4±0.2	1.0±0.1	0.8±0.1
162	2.8±0.3	2.2±0.1	1.8±0.1
212	5.5±0.3	2.1±0.1	2.2±0.1

Pode observar-se que o biofilme (biomassa aderida) foi aumentando ao longo do tempo de operação, atingindo um máximo de 5.5 g VS/m². A biomassa oclusa atingiu um máximo de 2.2 g SV/L_{vazio} e um aumento adicional na carga orgânica não produziu um aumento deste valor. Curiosamente, durante a experiência I foram obtidos valores de 2.2 e 2.1 gSV/L_{vazio} para a biomassa oclusa nos diâmetros maiores de vidro acrílico e PVC respectivamente, que são tamanhos semelhantes ao usado na experiência II. Este facto indicia que o efeito do tamanho pode ser dominante relativamente ao efeito da velocidade intersticial, já que as velocidades intersticiais nas duas experiências foram diferentes.

O aumento da importância da biomassa aderida durante a operação é evidenciado na Figura 4.11, onde se representa a evolução da fracção de biomassa aderida relativamente à biomassa total acumulada no suporte.

A fracção de biomassa aderida ao suporte aumentou linearmente com o tempo de operação, tendo-se obtido valores entre 19.8±3.9% e 40.3±2.7%, que são bastante superiores aos determinados no final da experiência I. No entanto, apenas o primeiro valor deve ser comparado com o obtido na experiência I por corresponder, aproximadamente, ao mesmo tempo de operação. Entre a experiência I e a experiência II, foram alteradas várias condições operatórias. A adição de macro e micronutrientes na experiência II e não na experiência I pode ter influenciado o processo de adesão tal como referido por HUANG E PINDER (1995) e por DANIELS (1980).

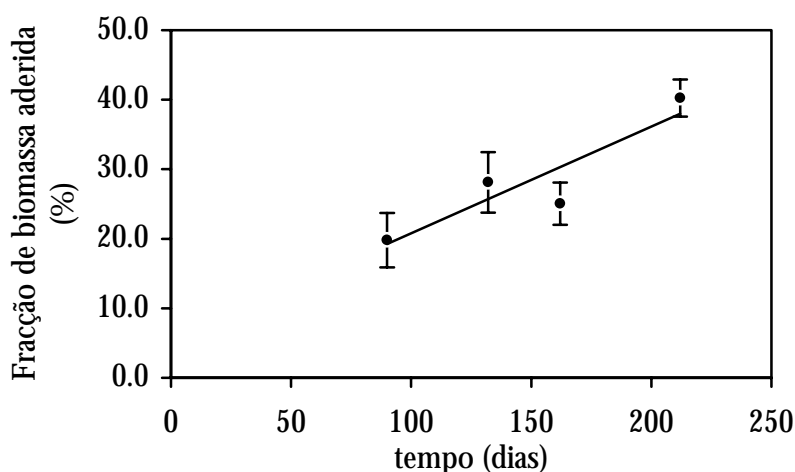


Figura 4.11 Evolução da fracção de biomassa aderida ao longo da operação durante a experiência II.

Por outro lado, utilizaram-se metodologias diferentes para remover a biomassa aderida nas experiências I e II, prevendo-se que tenha havido uma influência da metodologia utilizada na quantidade de biomassa removida, tal como referido por PIERZO *et al.* (1994).

4.4.2.2 Evolução da actividade metanogénica de diferentes grupos tróficos

A composição do consórcio foi avaliada ao longo da operação pela medição das actividades metanogénicas específicas utilizando substratos específicos directos da metanogénese (acetato e H_2/CO_2) e indirectos (propionato, butirato e etanol). Na Figura 4.12 está representada a evolução da actividade metanogénica acetoclástica e hidrogenofílica.

A actividade metanogénica acetoclástica atingiu um máximo de 621.4 ± 106.6 mL CH_4 @PTN/gSV.dia (162º dia de operação), a partir do qual foi observada uma tendência decrescente. Com o aumento da concentração de substrato na alimentação de 3 até 12 g CQO/L deve ocorrer uma expansão para a secção do suporte, da actividade acidogénica, até então mais localizada na base do reactor. As bactérias acetoclásticas, presentemente consideradas um dos elos mais fracos na cadeia da digestão anaeróbia devido à sua generalizada sensibilidade a condições adversas (COLLERAN, comunicação pessoal, 1996) sofrem um efeito de diluição efectivo com o aumento da actividade acidogenica que não é,

contudo, evidenciado pela actividade hidrogenofílica. Embora a actividade acidogénica não tenha sido medida no presente trabalho, o fenómeno de co-existência das bactérias acidogénicas e hidrogenofílicas e a diluição da actividade acetoclástica com biomassa acidogénica foi referido durante a operação do filtro anaeróbio segmentado descrito no **Capítulo 3** desta dissertação.

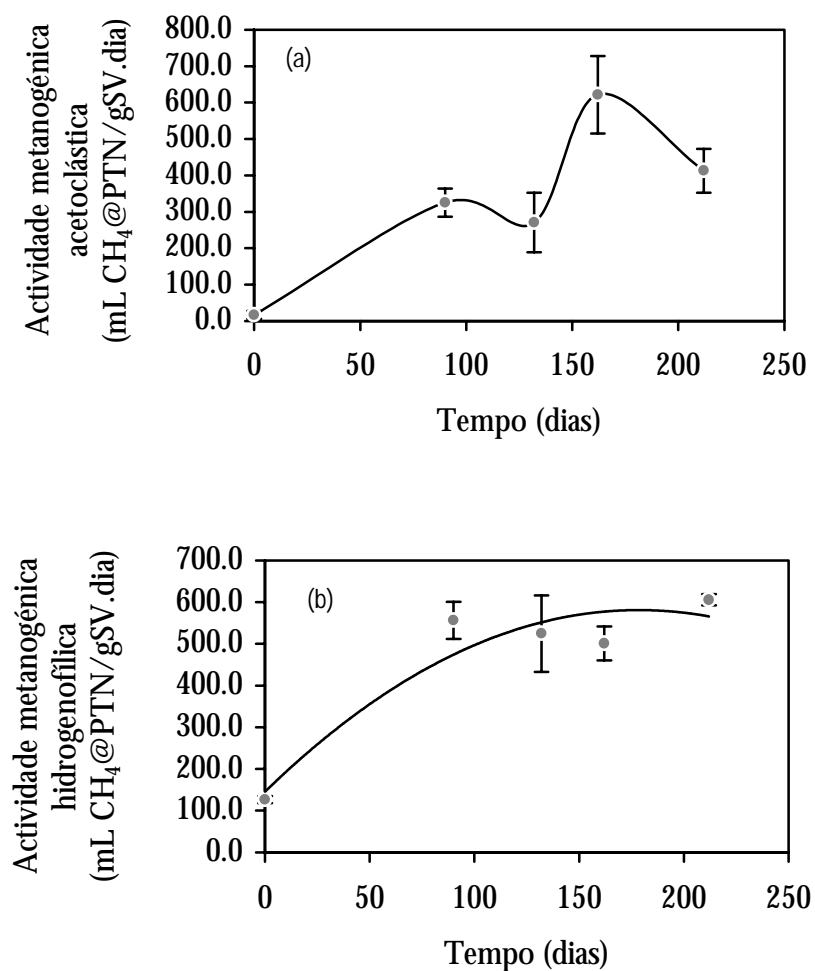


Figura 4.12 Evolução da actividade metanogénica específica em acetato (a) e em H₂/CO₂ (b).

A evolução da actividade metanogénica específica em propionato, butirato e etanol está representada na Figura 4.13. Deve lembrar-se que, dado que estes compostos são substratos indirectos da metanogénese os valores obtidos só representam a actividade das bactérias que degradam esses substratos, quando a actividade das bactérias envolvidas a jusante do processo (acetoclásticas e hidrogenofílicas) não são limitantes (DOLFING E BLOEMEN, 1985).

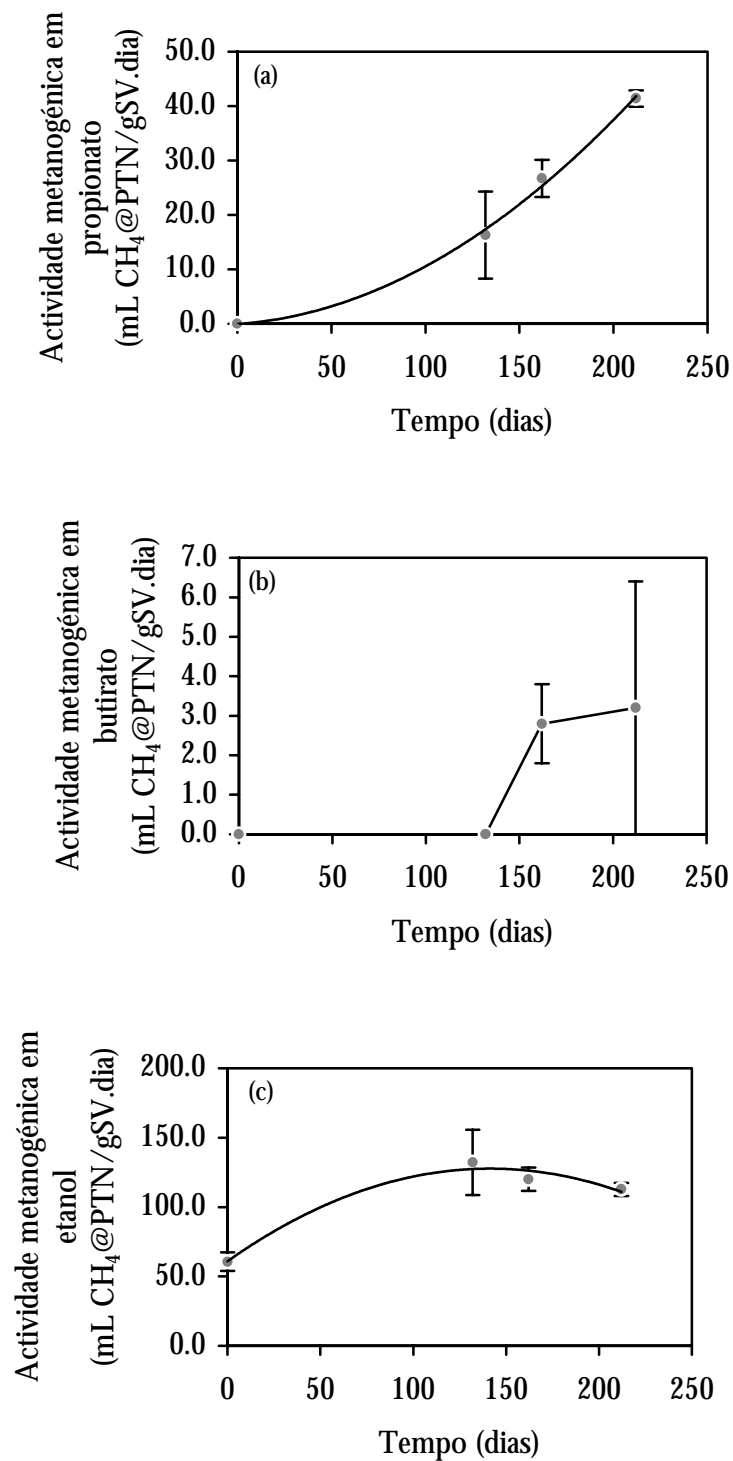


Figura 4.13 Actividade metanogénica específica em substratos indirectos: propionato (a), butirato (b) e etanol (c).

No caso presente, essa condição é válida para todas as amostras de biomassa analisadas, com excepção do inóculo.

Devido à pequena quantidade de biomassa disponível, estas actividades não foram medidas no 90º dia de operação. Embora o inóculo não apresentasse actividade detectável em propionato e em butirato (Figura 4.13 (a) e (b)), observou-se um desenvolvimento dessas actividades, especialmente em propionato, ao longo da operação. A actividade em butirato foi sempre muito baixa ($<5 \text{ mL CH}_4\text{@PTN/gSV.dia}$), o que pode explicar a grande flutuação nos valores medidos, traduzida pelo largo intervalo de confiança associado. A actividade das bactérias sintróficas consumidoras de etanol permaneceu estável após a fase de arranque, não tendo praticamente variado ao longo do tempo de operação (Figura 4.13 (c)).

4.5 Conclusões

Neste capítulo é apresentada uma metodologia que permite estudar interacções entre a biomassa e o suporte em filtros anaeróbios. O conceito baseia-se na distribuição do leito fixo de um biorreactor por mini-biorreactores colocados em paralelo e foi testado em duas aplicações distintas. Numa primeira experiência (experiência I) estudou-se uma configuração de suporte (anéis de *Raschig*) comparando três materiais e três tamanhos e foi possível concluir o seguinte:

- a biomassa oclusa (expressa como gSV/Lvazio) apresentou-se mais concentrada nos menores tamanhos de suporte;
- a biomassa aderida (expressa como gSV/m²) apresentou-se mais concentrada nos tamanhos de suporte maiores;
- a velocidade intersticial pode condicionar a distribuição da biomassa no suporte. Para os valores de maior velocidade intersticial, verificou-se que a biomassa aderida era menos concentrada e que a biomassa oclusa era mais concentrada do que nos casos em que a velocidade intersticial era menor;
- no vidro, que era a superfície mais lisa e mais hidrofílica foi observado um biofilme com menos sólidos voláteis por m², do que nos outros materiais. A visualização por microscopia electrónica de varrimento do biofilme desenvolvido nesta superfície, permitiu constatar a presença do género *Methanospirillum*, que se sabe ter apetência para superfícies hidrofílicas.

Numa segunda experiência, em que se seguiu a evolução da distribuição da biomassa e da actividade da biomassa durante uma operação de 246 dias, concluiu-se que:

- a biomassa aderida na superfície do suporte aumentou continuamente, até atingir um máximo de 40% da biomassa total retida no suporte;
- após um máximo de 621.4 mL CH₄@PTN/gSV.dia no 162º dia (correspondente a uma concentração de entrada de 9000 mg CQO/L), a actividade acetoclástica

diminuiu, enquanto que a actividade hidrogenofílica aumentou durante a fase de arranque e permaneceu praticamente constante durante todo o período de operação.

- a actividade metanogénica específica em propionato, butirato e etanol, que mede a actividade das bactérias sintróficas que degradam estes substratos, era praticamente ausente no inóculo (excepto no caso do etanol), mas aumentou significativamente durante o período de operação especialmente a actividade em propionato.

Com a metodologia desenvolvida foi possível estudar aspectos das interacções entre a biomassa e o suporte que não são normalmente considerados no estudo de digestores anaeróbios de leito fixo, por dificuldade de amostrar a biomassa desenvolvida.

No Capítulo 5 esta metodologia é utilizada para estudar o efeito do teor de lípidos nas características da biomassa desenvolvida em digestores de leito fixo.

5. Efeito dos lípidos e do ácido oleico no desenvolvimento da biomassa em digestores anaeróbios de leito fixo

Sumário

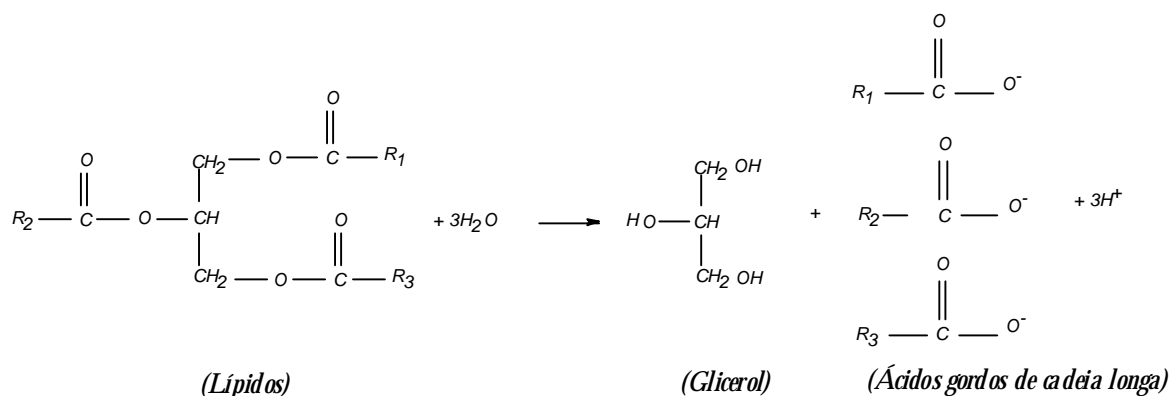
É utilizada a metodologia apresentada no **Capítulo 4** para estudar comparativamente o desenvolvimento da biomassa em digestores de leito fixo alimentados com diferentes teores de lípidos. Inicialmente operou-se um reactor (RI) com um efluente lácteo sintético com lípidos (leite gordo) e outro reactor (RII) com um efluente lácteo sintético sem lípidos (leite magro). Durante este período operatório (Período I), a biomassa de RI foi preferencialmente retida na forma oclusa (80-90%), mas em RII foi obtido um biofilme espesso que atingiu cerca de 40% da biomassa total. As actividades metanogénicas acetoclástica e hidrogenofílica, medidas ao longo do tempo de operação, foram muito semelhantes para ambos os digestores, mas a actividade metanogénica em butirato foi estimulada no reactor alimentado com lípidos. Inicialmente verificou-se que as bactérias metanogénicas acetoclásticas eram mais sensíveis à toxicidade do ácido oleico do que as hidrogenofílicas e determinou-se, evolutivamente, a resistência das bactérias acetoclásticas de ambos os digestores ao ácido oleico, medida pelo índice de toxicidade (IC_{50}). No período I verificou-se que as bactérias acetoclásticas do reactor RI eram mais sensíveis ao oleato do que as do reactor RII. Posteriormente, a alimentação de ambos os digestores foi alterada, passando a ser igual para ambos e constituída por oleato e um co-substrato (leite magro - Período II) e por apenas oleato com única fonte de carbono (Período III). Verificou-se que mais de 50% (em termos de sólidos voláteis) do biofilme formado na ausência de lípidos foi removido do suporte quando se passou a alimentar oleato. No entanto, o biofilme formado na presença de lípidos, embora menos concentrado em sólidos, foi mais resistente à presença de oleato, tendo mesmo sofrido um ligeiro aumento quando este composto foi introduzido na alimentação. As actividades metanogénicas acetoclástica e hidrogenofílica, continuaram a ser muito semelhantes para ambos os digestores e a actividade em butirato, tornou-se semelhante para ambos os digestores, tendo aumentado em RII e diminuído em RI. A resistência da biomassa de RII à toxicidade do ácido oleico foi reduzida, mas na biomassa de RI houve um aumento significativo no valor de IC_{50} o que indica que, para o tratamento de efluentes contendo ácido oleico, é benéfico aclimatizar a biomassa com lípidos, no sentido de obter uma maior resistência à toxicidade deste composto. No último período de operação observou-se que a biomassa estava encapsulada com oleato, tendo-se medido a taxa de conversão a metano do oleato adsorvido. Obtiveram-se valores de 105 e 103 mg CQO-CH₄/gSV.dia para a biomassa de RI e RII respectivamente, valores que são superiores à máxima taxa de degradação obtida em testes de biodegradabilidade do oleato com biomassa não encapsulada (86 mg CQO-CH₄/gSV.dia). Estes valores são substancialmente superiores aos referidos na literatura para a degradação de oleato em condições mesofílicas por biomassa granular.

Índice

5.1	INTRODUÇÃO	263
5.2	OBJECTIVOS	270
5.3	MATERIAIS E MÉTODOS	271
5.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	278
5.5	CONCLUSÕES	313

5.1 Introdução

Os lípidos são importantes constituintes da matéria orgânica dos efluentes e, embora nos efluentes domésticos existam em concentrações entre 40 a 100 mg/L (FORSTER, 1992, QUÉMÉNEUR E MARTY, 1994), a sua presença nos efluentes industriais é alvo de particular atenção. Lactínios, refinarias e matadouros são exemplos de indústrias cujos efluentes contêm lípidos em concentrações elevadas (RINZEMA, 1988). De entre as várias famílias de lípidos existentes, os tri-ésteres de glicerol e ácidos gordos são os mais abundantes na natureza. Exemplificando para esse tipo de lípidos, a sua hidrólise processa-se de acordo com a seguinte reacção:



Num digestor anaeróbio esta reacção é rápida, favorecendo a acumulação dos ácidos gordos de cadeia longa (AGCL) que mantêm cerca de 95 % da carga orgânica original. Na prática, e devido aos problemas que introduzem nos sistemas de tratamento biológico, é usual proceder a uma separação prévia da matéria gorda por métodos físico-químicos, por exemplo, por flutuação. No entanto, a fracção lipídica remanescente, na forma emulsionada ou coloidal é ainda prejudicial ao tratamento anaeróbio de efluentes (PERLE *et al.*, 1995).

A composição dos AGCL varia com o tamanho da cadeia de carbonos e com o grau de saturação. Na Tabela 5.1 estão representados alguns AGCL que ocorrem na natureza.

Tabela 5.1 Exemplos de alguns AGCL que ocorrem na natureza (adaptado de STRYER, 1981).

Nº de Carbonos	Nº de ligações duplas	Nome comum	Abreviatura	Fórmula química
saturados				
12	0	Láurico	C _{12:0}	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ COOH
14	0	Mirístico	C _{14:0}	CH ₃ (CH ₂) ₁₂ COOH
16	0	Palmítico	C _{16:0}	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ COOH
18	0	Estearico	C _{18:0}	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COOH
20	0	Araquídico	C _{20:0}	CH ₃ (CH ₂) ₁₈ COOH
insaturados				
16	1	Palmitoleico	C _{16:1, cis-9}	CH ₃ (CH ₂) ₅ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH
18	1	Oleico	C _{18:1, cis-9}	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH
18	2	Linoleico	C _{18:2, cis-9,12}	CH ₃ (CH ₂) ₄ (CH=CH(CH ₂)) ₂ (CH ₂) ₆ COOH
18	3	Linolénico	C _{18:3, cis-9,12,15}	CH ₃ CH ₂ (CH=CH(CH ₂)) ₃ (CH ₂) ₆ COOH
20	1	Gadoleico	C _{20:1, cis-9}	CH ₃ (CH ₂) ₉ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH

Devido à sua estrutura anfifílica, composta por uma cauda alifática apolar e por uma extremidade carboxílica polar, os AGCL, quando num meio aquoso, comportam-se como detergentes. A pH neutro encontram-se na forma ionizada, sendo frequente designá-los por essa forma, por exemplo oleato em vez de ácido oleico. Neste trabalho, ambas a formas serão utilizadas indiscriminadamente.

Os AGCL são convertidos em acetato e H₂ pelo mecanismo da β-oxidação, sendo a ω-oxidação secundária e não relevante na degradação destes compostos (WENG E JERIS, 1976). Estes autores propuseram dois mecanismos possíveis para a degradação do oleato. Num dos mecanismos, o ácido oleico é inicialmente convertido a ácido pelargónico, o qual origina acetato e propionato via β-oxidação. O propionato é então convertido a acetato e formato. O acetato origina metano e CO₂, e o formato dá origem a H₂ e CO₂. Segundo WENG E JERIS (1976), esta via de degradação tem um papel secundário na degradação do oleato, já que nos seus estudos não detectaram níveis significativos de propionato como intermediário (Figura 5.1). No segundo mecanismo proposto, o oleato é reduzido a estearato, o qual é degradado a acetato, via β-oxidação (Figura 5.2).

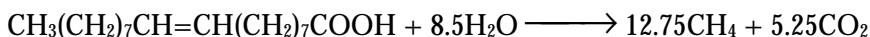
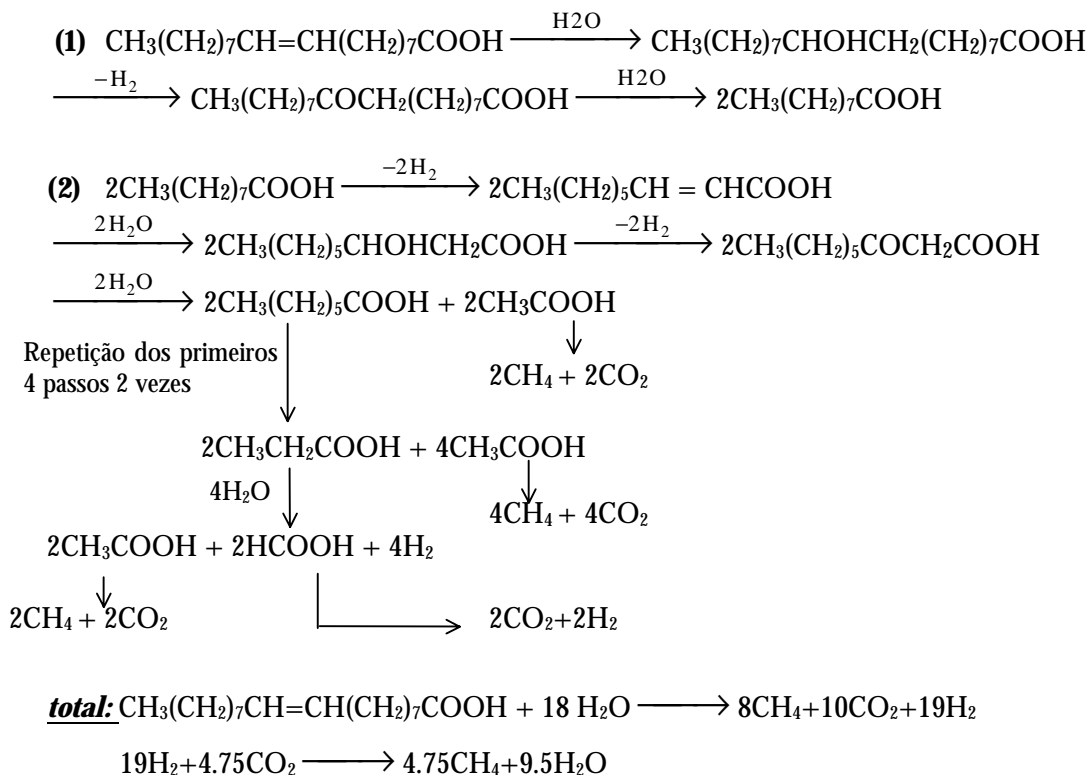


Figura 5.1 Mecanismo proposto por WENG E JERIS (1976) para a degradação do oleato (mecanismo de degradação 1).

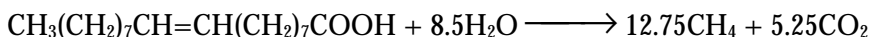
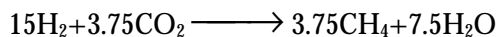
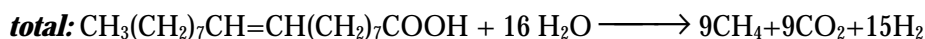
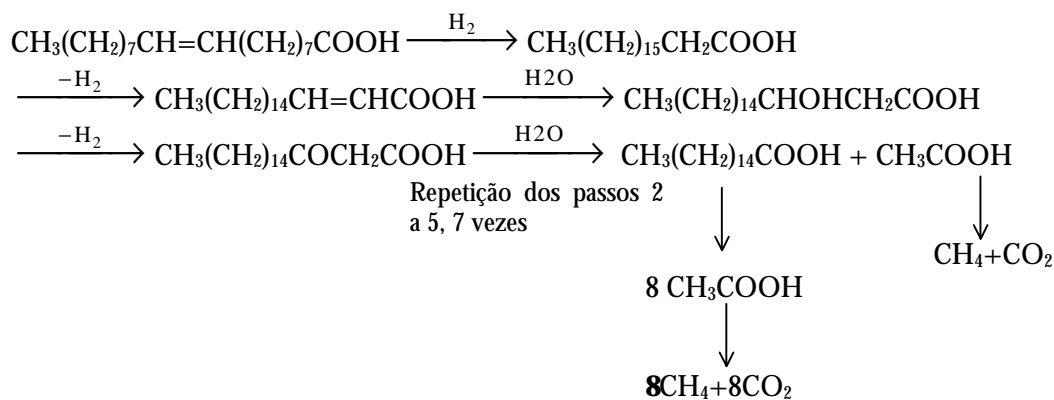


Figura 5.2 Mecanismo proposto por WENG E JERIS (1976) para a degradação do oleato (mecanismo de degradação 2).

Estas reacções só são termodinamicamente favoráveis se a pressão parcial de hidrogénio for mantida em níveis baixos, inferiores a 10^{-4} atm, o que é conseguido por associações sintróficas com bactérias metanogénicas hidrogenotróficas ou sulfato-redutoras (ROY *et al.*, 1986, ANGELIDAKI E AHRING, 1995). A β -oxidação parece ser o passo limitante da degradação de AGCL insaturados (NOVAK E CARLSON, 1970).

Os principais problemas associados com o tratamento anaeróbio de efluentes contendo lípidos são: i) a adsorção de lípidos e AGCL na biomassa, tornando-a flutuante e sujeita a eliminação por lavagem (“washout”) (HWU, 1997) e ii) a forte inibição das bactérias acetoclásticas e acetogénicas pelos AGCL (ROY *et al.*, 1986, KOSTER E CRAMER, 1987, RINZEMA *et al.*, 1994, HWU, 1997). As bactérias metanogénicas acetoclásticas parecem ser mais afectadas pelo efeito inibitório dos AGCL do que as metanogénicas hidrogenotróficas (HANAKI *et al.*, 1981).

A aplicação de sistemas de manto de lamas do tipo UASB e EGSB ao tratamento de efluentes contendo lípidos tem sido objecto de investigação recente (RINZEMA *et al.*, 1989, HWU *et al.*, 1997a, HWU *et al.*, 1997b). Embora haja evidência de que a biomassa granular é mais resistente à toxicidade dos AGCL do que a biomassa dispersa ou floculenta, é também evidente que a granulação e a estabilidade granular são problemáticas no tratamento de efluentes contendo lípidos (HAWKES *et al.*, 1995, SAM-SOON *et al.*, 1991, Hwu *et al.*, 1997a).

SAMSON *et al.* (1985 b) descreveram a falha dum digestor UASB industrial devido a problemas de flutuação, durante o tratamento do efluente de uma indústria de lacticínios. HAWKES *et al.* (1995), compararam diversos tipos de digestores para o tratamento de efluentes de uma indústria de gelados tendo concluído que a granulação não era viável nesse tipo de efluente e que o filtro anaeróbio era a configuração de digestor mais adequada. RINZEMA (1988) observou que a aplicação de um digestor UASB convencional a efluentes contendo AGCL resultava na acumulação e sobrecarga local desses compostos a par de um elevado “washout” causado pela flutuação da biomassa encapsulada. Este autor concluiu ainda que, para um efluente contendo AGCL, a configuração alternativa de manto de lamas com recirculação (EGSB) podia ser aplicada, mas para efluentes contendo lípidos, tinha de ser implementado um separador tipo peneiro para impedir a saída da biomassa. SAM-SOON *et al.* (1991) utilizaram um UASB no tratamento de um efluente sintético contendo oleato como

única fonte de carbono e observaram que os grânulos inicialmente inoculados se desintegraram e se encapsularam por uma massa esbranquiçada e gelatinosa.

Do ponto de vista termodinâmico, a desintegração granular é previsível porque, a pH neutro, os AGCL actuam como detergentes, baixando a tensão superficial. Consequentemente, a agregação de bactérias hidrofóbicas, como são a maior parte das acetogénicas (consumidoras de AGCL) é desfavorável, aumentando a probabilidade de “washout” destas bactérias. (DAFFONCHIO *et al.*, 1995, HWU *et al.*, 1997b).

HWU *et al.* (1997a) concluíram que os parâmetros operatórios típicos do digestor UASB (velocidade superficial > 4 m/h e tempo de retenção hidráulico (TRH) < 10 h) diminuía a eficiência de sistemas de tratamento de efluentes contendo AGCL. Estes autores concluíram ainda que a recirculação da biomassa que era arrastada na corrente de saída, que apresentava uma elevada capacidade de biodegradação de oleato, aumentava a eficiência do sistema (HWU *et al.*, 1997b).

Os trabalhos publicados sugerem que os AGCL exercem um efeito bactericida nas bactérias metanogénicas e não são evidenciados mecanismos de adaptação à toxicidade destes compostos. A recuperação após uma fase de latência muitas vezes observada em ensaios em reactor fechado é atribuída ao crescimento de algumas bactérias sobreviventes (RINZEMA *et al.*, 1994). Estes autores concluíram que as bactérias metanogénicas acetoclásticas não se adaptam ao efeito tóxico dos AGCL, nem após uma exposição repetida a concentrações tóxicas, nem após uma exposição prolongada a concentrações sub-tóxicas. HANAKI *et al.* (1981) concluíram que a fermentação da glucose não era afectada pela presença de AGCL, que a adição de acetato e butirato intensificavam o efeito inibitório dos AGCL e que o oleato era menos inibitório do que uma mistura de AGCL. ANGELIDAKI E AHRING, (1992) sugeriram que a resposta à adição de lípidos pode depender do grau de adaptação aos lípidos enquanto que a adição directa de AGCL acima de determinada concentração, pode resultar mais rapidamente na falha do processo.

O mecanismo de toxicidade dos AGCL está relacionado com a adsorção destes compostos na membrana celular, afectando as funções de transporte e de protecção da célula. (DEMEYER E HENDERICKX, 1967, GALBRAITH *et al.*, 1973, RINZEMA, 1988). Este facto poderia sugerir que a toxicidade dos AGCL estava relacionada com a relação concentração de

AGCL/concentração de biomassa. Contudo, KOSTER E CRAMER (1987) e RINZEMA *et al.* (1994) demonstraram que o efeito inibitório é meramente dependente da concentração.

RINZEMA (1988) concluiu que o principal problema do tratamento anaeróbio, em digestores de manto de lamas, de efluentes contendo lípidos, era a flutuação da biomassa e não o efeito inibitório dos AGCL sobre a população bacteriana. Hwu (1997), que estudou a adsorção de AGCL relacionando-a com a flutuação da biomassa, também sugeriu que o “*washout*” da biomassa devido à flutuação ocorre antes da inibição ou seja para concentrações inferiores. Além disso, sabe-se que a adição de sais de cálcio diminui o efeito inibitório dos AGCL, mas não previne os problemas de flutuação (HANAKI *et al.*, 1981, RINZEMA, 1988). Num digestor anaeróbio de leito fixo, o meio de suporte actua como um factor fisico de protecção contra o “*washout*”, sendo potencialmente atractivo para a retenção de biomassa na aplicação a este tipo de efluentes.

O efeito tóxico dos lípidos/AGCL foi apontado para explicar os resultados obtidos durante a operação de um digestor de leito fixo laboratorial, que se passa a descrever. Na sequência do estudo de operação de um filtro anaeróbio laboratorial de 14 Litros de volume, a operar com um substrato lácteo sintético sem lípidos durante 230 dias (ALVES, 1992) e após 240 dias sem operar, reiniciou-se a operação com o mesmo tipo de substrato. Devido a má embalagem do leite comercial utilizado como substrato (leite gordo embalado em pacotes de leite magro !), alimentou-se um substrato com lípidos no dia 512 de operação, dia em que por coincidência se tinha decidido aumentar o caudal de alimentação. A carga orgânica atingiu um pico três vezes superior ao valor anteriormente aplicado (Figura 5.3 (a)) Os ácidos voláteis na corrente de saída aumentaram significativamente e nem uma posterior redução da carga orgânica fez os níveis de AGV descer aos valores que anteriormente tinham sido obtidos para os mesmos níveis de carga orgânica aplicada (dia 100-150), obtendo-se teores de AGV 10 a 20 vezes superiores (Figura 5.3 (b)). Variações posteriores da carga orgânica resultaram em alterações bruscas da concentração de AGV na corrente de saída e na eficiência, o que sugere uma operação instável, mesmo 100 dias após o choque.

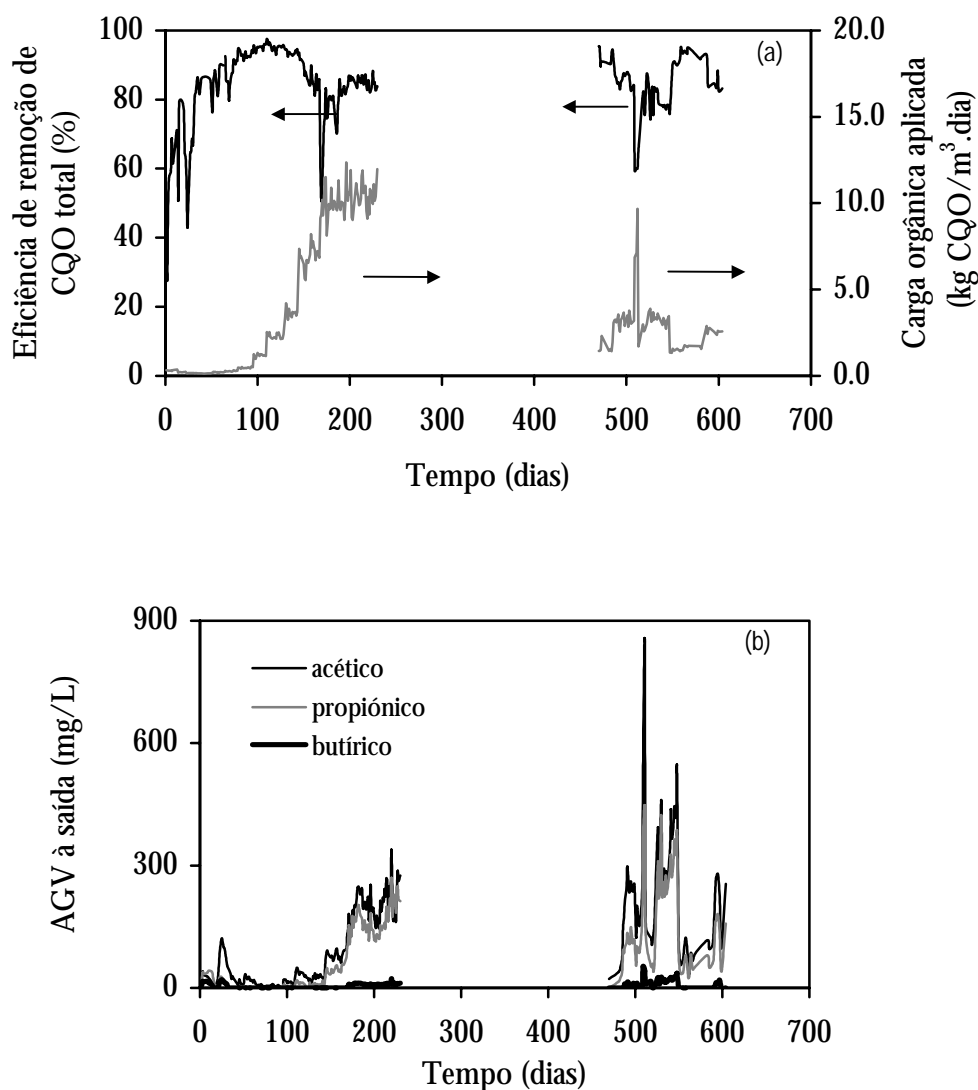


Figura 5.3 Resultados da operação de um filtro anaeróbio laboratorial. Eficiência de remoção e carga orgânica aplicada (a). Teores de AGV na corrente de saída (b).

A questão da adaptação da biomassa anaeróbia à toxicidade e biodegradabilidade dos lípidos tem sido estudada essencialmente em ensaios em reactor fechado. Pensa-se que estes ensaios são importantes se realizados como complemento de operações de longo termo de digestores pois permitem avaliar as características potenciais da biomassa e sua evolução com o tempo e as condições operatórias.

5.2 Objectivos

O objectivo deste trabalho foi estudar a biomassa desenvolvida num digestor de leite fixo alimentado com concentrações crescentes de lípidos (leite gordo) e compará-la com a dum digestor alimentado com um substrato sem lípidos (leite magro). Numa segunda fase do trabalho, avaliou-se o efeito de alterar gradualmente a composição dos substratos originalmente alimentados aos digestores passando por misturas de oleato de sódio e um co-substrato (leite magro) e posteriormente para oleato como única fonte de carbono. Foram analisadas as seguintes características da biomassa:

- Distribuição entre as fracções aderida e oclusa no suporte,
- composição do consórcio anaeróbio por determinação da actividade metanogénica potencial em acetato, H_2/CO_2 , propionato, butirato e etanol,
- tolerância ao oleato de sódio pela medida do índice de toxicidade (IC_{50}) deste composto sobre as bactérias metanogénicas acetoclásticas,
- capacidade de biodegradação do oleato de sódio.

O oleato de sódio foi usado como modelo de ácido gordo de cadeia longa porque é, em geral, o mais abundante entre os AGCL presentes em efluentes (KOMATSU *et al.*, 1991), é bastante solúvel em água, é o principal AGCL resultante da degradação do leite gordo (HANAKI *et al.*, 1981), que foi o substrato utilizado na primeira parte do trabalho e, além disso, é um dos AGCL mais tóxicos (GALBRAITH *et al.*, 1971).

5.3 Materiais e Métodos

5.3.1 Instalação experimental

Utilizaram-se dois digestores anaeróbios de leito fixo idênticos aos previamente descritos no **Capítulo 4, sub-Capítulo 4.3.1**, página **239**. O suporte foi constituído por anéis de *Raschig* em PVC com 21 mm de diâmetro e a configuração da matriz de suporte foi igual para ambos os digestores e igual à descrita no **sub-Capítulo 4.3.1.2**, página **242**. Ambos os biorreactores foram abertos 6 vezes durante a operação, segundo o procedimento descrito no **sub-Capítulo 4.3.2** (página **242**), para a experiência II. A temperatura de operação foi mantida em $35 \pm 1^\circ\text{C}$.

5.3.2 Substrato e inóculo

Inicialmente alimentou-se um dos biorreactores com leite gordo (RI) e outro com leite magro (RII), diluídos com água da rede municipal e suplementados com macro e micro-nutrientes, de acordo com a seguinte composição:

Macronutrientes - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 30.2 g/L; KH_2PO_4 : 28.3 g/L KCl : 45 g/L. Esta solução foi adicionada numa quantidade de 0.6 mL por grama de CQO alimentado.

Micronutrientes - $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 2 g/L; H_3BO_3 : 0.05 g/L; ZnCl_2 : 0.05 g/L; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0.038 g/L; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 0.5 g/L; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 0.05 g/L; $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 0.09 g/L; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 2 g/L; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 0.092 g/L; $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 0.164 g/L; EDTA: 1g/L, Resazurina: 0.2 g/L; HCl 37%: 1 mL/L. A composição desta solução baseou-se no trabalho de ZEHNDER *et al.* (1980). Esta solução adicionou-se numa quantidade fixa de 1ml por litro de alimentação. Foram ainda adicionados 5 g NaHCO_3 /L para manter a alcalinidade entre 2500 e 5000 mgCaCO_3 /L.

O inóculo foi obtido de um digestor anaeróbio de tratamento de lamas integrado na estação de tratamento de águas residuais de Cambados, Maia. Após remoção dos sólidos mais grosseiros fazendo passar as lamas por um crivo com 0.7 mm de abertura de malha, ambos os digestores foram inoculados com 11 Litros de lamas, contendo 25.7 g SV/L.

5.3.3 Controlo analítico de rotina

A operação dos reactores foi seguida pela análise periódica (três a quatro vezes por semana) da Carência Química de Oxigénio (CQO) nas correntes de entrada e saída, dos Ácidos Gordos Voláteis (AGV) na corrente de saída e dos caudais de alimentação. Os métodos analíticos utilizados foram descritos nos **sub-Capítulos 3.3.3.1, 3.3.3.2, 3.3.3.3 e 3.3.3.4**, páginas **110 a 112** desta dissertação.

5.3.4 Caracterização da biomassa

5.3.4.1 *Recolha, separação e quantificação das fracções de biomassa*

O procedimento de recolha, separação e quantificação das fracções de biomassa foi previamente descrito no **sub-Capítulo 4.3.5.1**, (página **244**) para a experiência II.

5.3.4.2 *Testes de actividade metanogénica*

A actividade metanogénica específica da biomassa oclusa foi determinada para 4 substratos líquidos (acetato, propionato, butirato e etanol) e para uma mistura gasosa de H_2/CO_2 , de acordo com o método descrito no **sub-Capítulo 3.3.4.2**, página **114**

5.3.4.3 *Testes de toxicidade metanogénica*

O efeito de um inibidor na actividade específica de um grupo trófico específico do consórcio, pode ser determinado por acompanhamento da produção de biogás, em frascos selados onde, para além do substrato específico do grupo trófico, é adicionado o inibidor a testar. O procedimento utilizado foi descrito por COLLERAN E PISTILLY (1994).

Meio basal (tampão anaeróbio)

O meio basal utilizado nos testes de toxicidade foi igual ao utilizado nos testes de actividade metanogénica, descrito no **sub-Capítulo 3.3.4.2**, página **114**.

Substrato

Dado que se pretendia avaliar o efeito do oleato de sódio sobre as bactérias metanogénicas acetoclásticas, o substrato utilizado foi o acetato. A solução “*stock*” foi preparada numa concentração 3M, 100 vezes superior à concentração de trabalho. Esta

solução foi neutralizada a pH 7 com NaOH e armazenada a 4 °C. Tal como descrito para os testes de actividade, adicionou-se um volume de 125 µl num volume total de trabalho de 12.5 mL.

Inibidor

O inibidor testado foi o oleato de sódio. As soluções “*stock*” de oleato de sódio foram preparadas em condições anaeróbias estritas, na presença de N₂/CO₂ (80/20). Prepararam-se cinco soluções com concentrações de 1000, 3000, 5000, 7000 e 9000 mg oleato/L, 10 vezes concentradas relativamente às concentrações de trabalho. Para facilitar a dissolução do oleato de sódio as soluções já em frascos selados com rolhas de borracha e cápsulas metálicas foram colocadas num banho de ultra sons durante aproximadamente 5 minutos. A cada frasco do teste adicionou-se 1.25 mL de cada solução, correspondendo a concentrações finais de 100, 300, 500, 700 e 900 mg de oleato/L.

Procedimento experimental e cálculo do índice de toxicidade

Tal como no caso dos testes de actividade, os ensaios de toxicidade foram realizados em triplicado, envolvendo um total de 21 frascos. Em 5 dos 7 grupos de três frascos adicionou-se acetato e oleato nas concentrações já referidas e os outros dois trios de frascos constituíram os brancos, sem substrato e sem inibidor, e os controlos, com substrato mas sem inibidor.

O procedimento experimental e o cálculo da actividade foi idêntico ao descrito para os testes de actividade metanogénica. Após aclimatização a 37 °C durante a noite, adicionaram-se 125 µl de substrato (acetato) e 1.25 mL de cada uma das soluções “*stock*” de oleato.

Em alguns casos verificou-se a existência de uma fase de latência a preceder o início da produção de metano. A duração desse período foi determinada graficamente tal como exemplificado no esquema da Figura 5.4. Nesses casos, a produção inicial de metano era nula ou da mesma ordem de grandeza da observada nos ensaios em branco, resultando numa actividade metanogénica nula ou muito baixa.

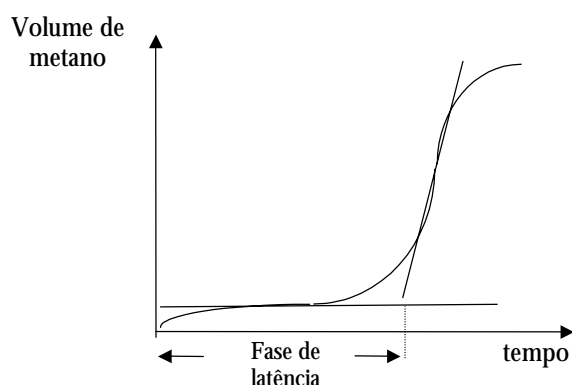


Figura 5.4 Exemplo do cálculo gráfico da duração da fase de latência.

A toxicidade do oleato de sódio foi expressa em termos do índice de toxicidade (IC_{50}) que representa a concentração de oleato para a qual a actividade é reduzida a 50% da actividade máxima (obtida para concentração nula de oleato). Este cálculo foi feito graficamente tal como exemplificado na Figura 5.5.

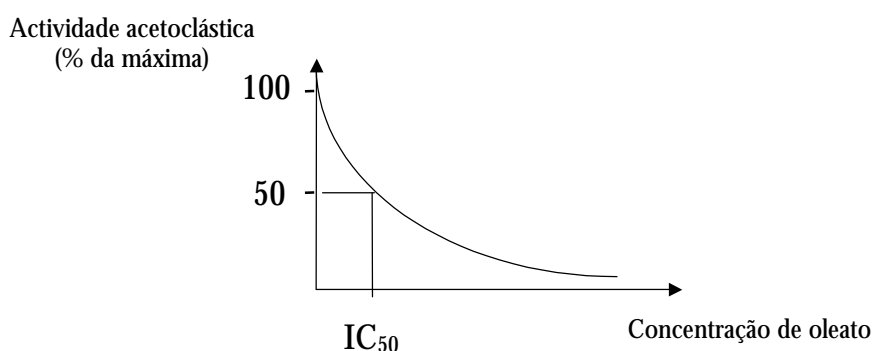


Figura 5.5 Cálculo gráfico do índice de toxicidade (IC_{50}).

5.3.4.4 Testes de biodegradabilidade do oleato de sódio

Os testes de biodegradabilidade foram realizados para avaliar a capacidade da biomassa biodegradar o oleato de sódio. Caracterizou-se apenas a biomassa oclusa do reactor RI (inicialmente alimentado com substrato contendo lípidos), dado que no reactor RII a biomassa desenvolvida nas primeiras etapas de operação, não foi suficiente para esta determinação.

Meio basal (tampão anaeróbio)

Foi utilizado o mesmo tampão dos testes de actividade e que foi descrito no **sub-Capítulo 3.3.4.2**, página 114.

Substrato

O substrato utilizado foi o oleato de sódio nas mesmas concentrações dos testes de toxicidade. Foram preparadas soluções “*stock*” tal como descrito no **sub-Capítulo 5.3.4.3**, página 272.

Procedimento experimental e cálculo da taxa de produção de metano

Os testes de biodegradabilidade do oleato de sódio foram realizados em duplicado, correspondendo cada par de frascos a concentrações de 100, 300, 500, 700 e 900 mg oleato/L. O procedimento foi semelhante ao descrito para os testes de actividade e toxicidade. No final calculou-se a produção específica de metano de acordo com

$$\text{Produção específica de metano (mL CH}_4\text{ / gSV.dia)} = \frac{\text{mL/h} \times 24 \times \text{MP} \times \text{FC}}{\text{SV}} \quad (5.1)$$

em que

mL/h representa a produção inicial de metano,

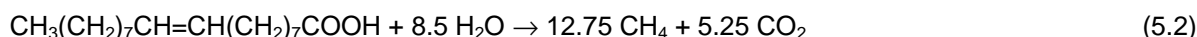
MP é a percentagem de metano no biogás produzido durante o teste e calculada de acordo com a equação 3.3,

FC é o factor de calibração do transdutor de pressão (**Apêndice C**)

SV é o teor de sólidos voláteis presentes no frasco.

A duração das fases de latência observadas em alguns testes de biodegradabilidade foi calculada graficamente de acordo com o esquema da Figura 5.4. Foram descontados, nos valores da produção de metano, os valores calculados do mesmo modo para os ensaios em branco.

A estequiometria da degradação do ácido oleico a metano é



Por cada mole de ácido oleico produzem-se 12.75 moles de CH₄ que, nas condições normais de pressão e temperatura, correspondem a 285.6 litros de metano. Na Tabela 5.2 estão representados os valores do volume de metano teoricamente produzidos pela conversão completa do oleato nos testes de biodegradabilidade.

Tabela 5.2 Produção de metano por conversão completa do oleato nos testes de biodegradabilidade

oleato (mg/L)	oleato (mM)	oleato (mmoles)	metano (mmoles)	metano (mL PTN)
100	0.329	0.004	0.052	1.16
300	0.987	0.012	0.157	3.52
500	1.645	0.021	0.268	6.00
700	2.303	0.029	0.370	8.29
900	2.961	0.037	0.472	10.57

Definiu-se uma taxa média de metanização (TM) como sendo a razão entre o volume total de metano produzido no teste e o volume total de metano teoricamente esperado, se todo o ácido oleico fosse convertido em metano. Refere-se taxa média porque representa a média das cinco concentrações de oleato testadas (Figura 5.6).

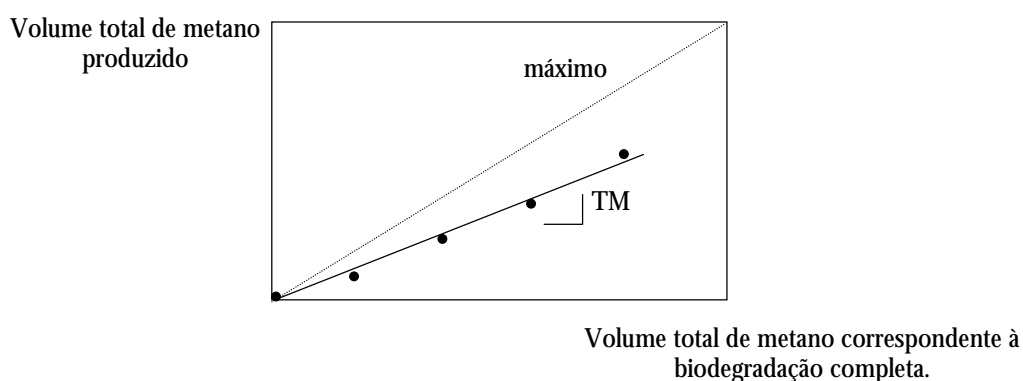


Figura 5.6 Definição da taxa média de metanização obtida nos testes de biodegradabilidade.

5.3.5 Modo de operação

Durante a fase de arranque ambos os digestores foram alimentados com leite magro. Após esse período a alimentação de RI foi gradualmente alterada para leite gordo, enquanto que no reactor RII o leite magro foi alimentado durante 212 dias (Período I). Durante o período II de operação alimentaram-se ambos os reactores com o mesmo substrato constituído por leite magro e concentrações crescentes de oleato de sódio e no período III foi alimentado, a ambos os digestores, oleato de sódio como única fonte de carbono. Na Tabela 5.3 estão resumidos os dados relativamente ao tipo de substrato alimentado e à duração dos 3 períodos de operação.

Tabela 5.3 Descrição do tipo de substrato alimentado aos digestores RI e RII e duração dos períodos de operação.

Período	RI			RII		
	Tempo (dias)	Tipo de conteúdo em lípidos/AGCL do substrato	Substrato	Tempo (dias)	Tipo de conteúdo em lípidos/AGCL do substrato	Substrato
I	0-29	nenhum	leite magro	0-29	nenhum	leite magro
	29-71	concentração e	leite magro	29-71	nenhum	
	71-76	carga de lípidos	mistura	71-76	nenhum	leite magro
	76-212	crescente	leite gordo	76-212	nenhum	
II	212-363	concentração de oleato crescente com co-substrato (carga orgânica constante)	leite magro +oleato de sódio	212-363	concentração de oleato crescente com co-substrato (carga orgânica constante)	leite magro +oleato de sódio
III	363-426	oleato única fonte de carbono (carga orgânica constante)	oleato de sódio	363-426	oleato única fonte de carbono (carga orgânica constante)	oleato de sódio

A concentração de substrato variou entre 3 e 12 g CQO/L durante o período I e manteve-se constante em 12 g CQO/L a partir do 162º dia de operação. O tempo de retenção inicial foi de 0.92 dias (calculado com base no volume total da secção da matriz de suporte (zona II do reactor, **Figura 4.1, sub-Capítulo 4.3.1**, página **239**), passando para 1.4 dias a partir do dia 114 de operação. Aplicou-se um caudal de recirculação para aproximar a velocidade superficial dos valores típicos de filtros anaeróbios laboratoriais, tendo-se fixado em 0.43 m/dia.

5.4 Resultados e Discussão

5.4.1 Operação e desempenho dos digestores

A carga orgânica aplicada em ambos os digestores foi aumentada gradualmente, até atingir 8.6 kg CQO/m³.dia no dia 162 (Figura 5.7 (a) e (b)). A partir do dia 162, a carga orgânica aplicada permaneceu constante (CQO na alimentação=12 000 mg/L e TRH=1.4 dias), mas a composição do substrato variou. Na Figura 5.7 (b) está representada a CQO total alimentada a ambos os digestores e a CQO correspondente ao oleato, podendo ser observado que até ao dia 246 não foi adicionado oleato a RII. Até ao dia 212 foi alimentado leite gordo ao reactor RI e o equivalente em oleato foi calculado considerando que o leite gordo contém 44% (em CQO) de lípidos, dos quais 39% são convertidos em oleato (HANAKI *et al.*, 1981). Após o dia 246, a alimentação foi idêntica para ambos os digestores, a CQO total foi mantida constante, mas a concentração de oleato foi aumentando progressivamente até que no último período de operação, a partir do dia 363, foi alimentado apenas oleato como única fonte de carbono (Figura 5.7 (b)). A eficiência de remoção do reactor RI foi sempre superior a 90%, mas em RII atingiu um valor médio mínimo de 76%, entre os dias 90 e 114. Após esse período de instabilidade de RII, decidiu-se aumentar o tempo de retenção hidráulico em ambos os digestores de 0.92 para 1.4 dias, reduzindo consequentemente a carga orgânica aplicada (Figura 5.7 (a)). Os ácidos voláteis na corrente de saída também sofreram um aumento até cerca de 1000 mg CQO/L durante o mesmo período, mas estabilizaram em valores de cerca de 100-200 mg CQO/L após a redução na carga orgânica (Figura 5.7 (c)). Durante o período I de operação, a concentração à entrada variou entre 3000 e 12 000 mg CQO/L em ambos os digestores e, consequentemente, os ácidos voláteis na corrente de saída aumentaram tal como pode ser observado na Figura 5.7 (c). Contudo, contrariando o esperado aumento de AGV devido a inibição das bactérias metanogénicas, os valores de AGV à saída do reactor alimentado com o substrato lipídico (RI) foram 2 a 3 vezes inferiores aos do reactor RII. Este facto é evidenciado na Figura 5.8 onde estão representados os valores médios de estado (pseudo) estacionário observados durante o período I em função da carga orgânica aplicada.

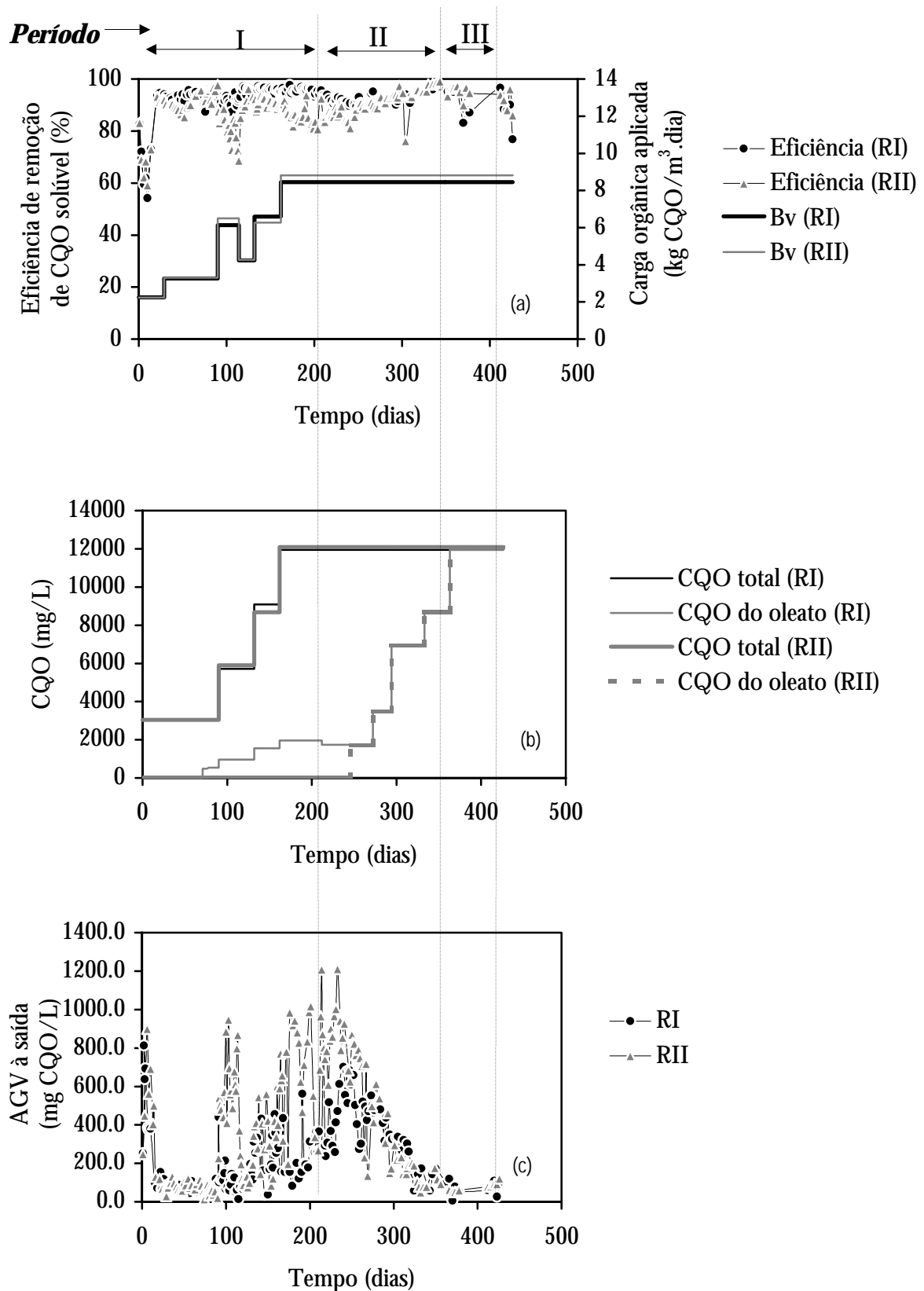


Figura 5.7 Condições operatórias e desempenho dos digestores RI e RII. Eficiência de remoção e carga orgânica aplicada (a), CQO total e do oleato alimentada (b) e ácidos voláteis na corrente de saída (c).

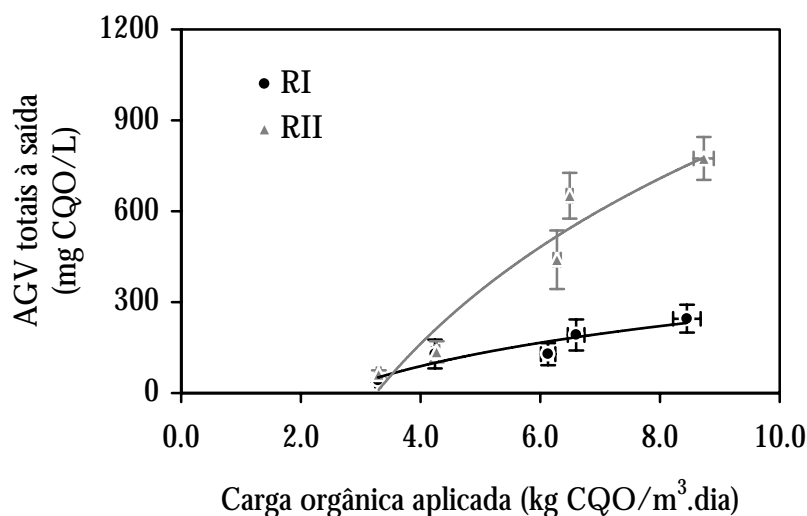


Figura 5.8 Variação da concentração média de AGV totais à saída com a carga orgânica aplicada a RI e RII durante o período I de operação.

Do mesmo modo, durante o período II, em que a carga orgânica foi mantida constante mas a concentração de oleato aumentou em ambos os digestores, foi observado um decréscimo dos níveis de AGV que se mantiveram-se estacionários no Período III, em que o oleato era a única fonte de carbono alimentada a ambos os digestores (Figura 5.9).

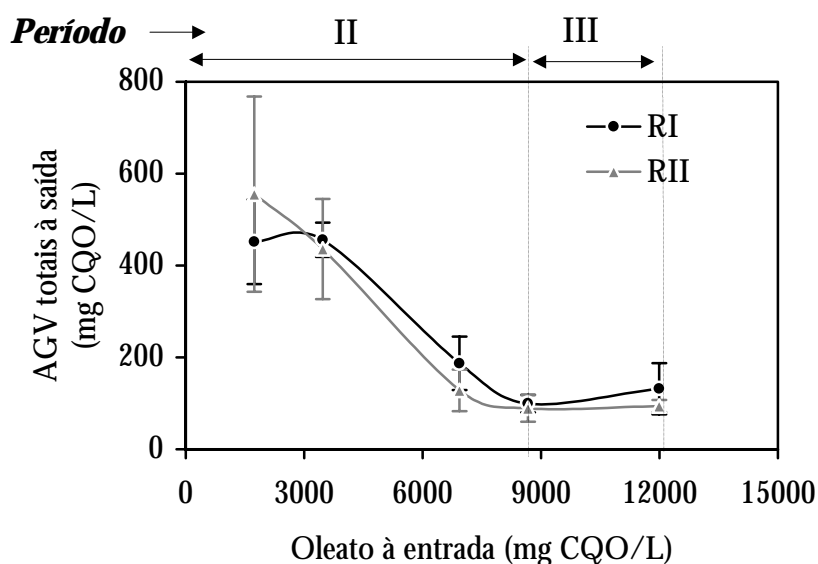


Figura 5.9 Variação da concentração média de AGV totais à saída com a concentração de oleato na alimentação durante os períodos II e III de operação.

A possibilidade de haver uma inibição das bactérias acetogénicas envolvidas na β -oxidação por parte da matéria lipídica, implicaria uma acumulação de substrato não acidificado que se traduziria numa menor eficiência em RI do que em RII.

Na Figura 5.10 está representada a relação entre as concentrações de substrato não acidificado à saída de RI e de RII e a carga orgânica aplicada, durante o período I. À semelhança do que aconteceu com os AGV, também a fracção de substrato não acidificado foi menor à saída de RI do que de RII, eliminando a hipótese da acumulação de substrato não degradado na corrente de saída por inibição das bactérias acetogénicas. A menor concentração de AGV e de substrato não acidificado em RI do que em RII traduz-se numa melhor eficiência de remoção de RI relativamente a RII neste período de operação, que já tinha sido observada na Figura 5.7 (a). Contudo, relativamente aos períodos II e III e tal como também pode ser observado na Figura 5.7(a) não é evidente uma diferença entre RI e RII em termos de eficiências de remoção, o que pode ser justificado pelo facto de se terem alimentado ambos os digestores com o mesmo tipo de substrato, nesses períodos. A pré-exposição a lípidos de RI durante o período I, não afectou o comportamento em termos de remoção de CQO no tratamento do efluente com oleato (períodos II e III).

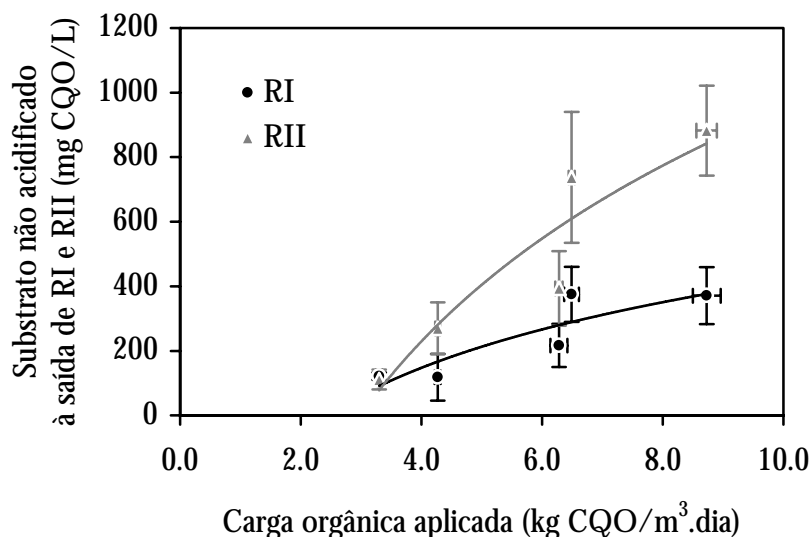


Figura 5.10 Variação da concentração de substrato não acidificado à saída de RI e de RII com a carga orgânica aplicada, durante o período I de operação.

Na Figura 5.11 está representada a relação entre as concentrações de substrato não acidificado à saída de RI e de RII, durante os períodos II e III em função das concentrações de oleato à entrada. No geral, durante estes dois períodos de operação RI teve uma eficiência ligeiramente menor que RII, o que é consequência das maiores concentrações de substrato não acidificado e dos valores de AGV à saída, sensivelmente superiores aos de RII. (Figura 5.9).

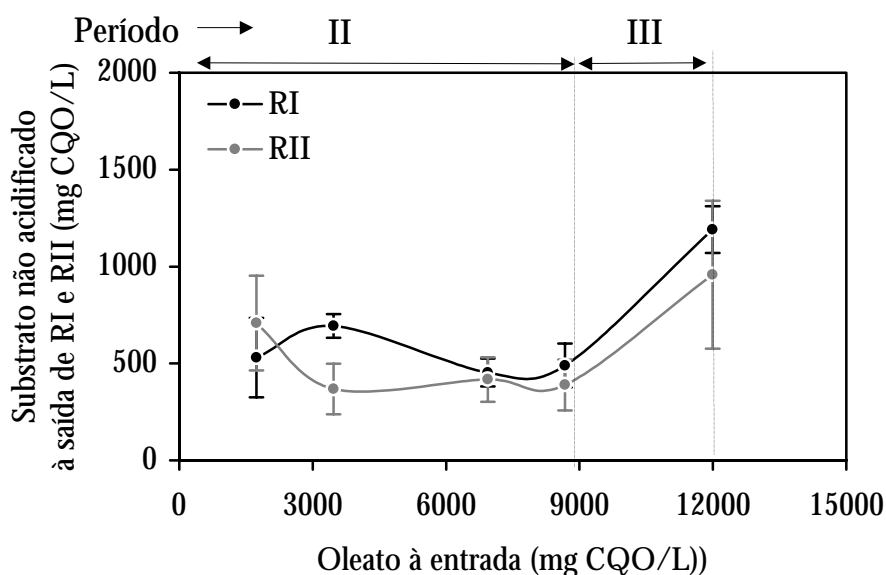


Figura 5.11 Variação da concentração de substrato não acidificado à saída de RI e de RII com a concentração de oleato à entrada, durante os períodos II e III de operação.

Verificou-se um aumento acentuado, superior a 100%, da concentração de substrato não acidificado à saída de ambos os digestores no período III em que o oleato era a única fonte de carbono, alimentada a uma concentração de 12 000 mg CQO/L. De salientar que a concentração total e a carga orgânica foram mantidas constantes durante os dois períodos pelo que esse aumento se deve provavelmente à inibição das bactérias acetogénicas pela elevada concentração de oleato ou pela ausência de co-substrato.

Os resultados obtidos na operação dos digestores devem ser discutidos tendo em conta os teores de cálcio na alimentação. É sabido que a presença de íões cálcio reduz o efeito inibitório dos AGCL, baixando a sua concentração na forma solúvel, concentração essa que depende das concentrações relativas de cálcio e oleato e do produto de solubilidade do sal

oleato de cálcio (ROY *et al.*, 1985). RINZEMA (1988) constatou a acumulação de precipitados de sais de ácidos gordos de cadeia longa no leito de lamas de um UASB e RINZEMA *et al.* (1989) estudaram o efeito da adição de iões Ca^{2+} na operação em contínuo de um UASB alimentado com ácido láurico. Verificaram que a adição de Ca^{2+} em quantidade equivalente ao ácido láurico presente, preveniu a inibição, até concentrações do referido AGCL de 1500 mg/L, face aos 100 mg/L inibitórios na ausência de iões cálcio. Também HANAKI *et al.* (1981) constataram que a adição de CaCl_2 numa quantidade cinco vezes superior à estequiometricamente necessária para haver precipitação dos AGCL presentes, eliminava a fase de latência que antecedia a produção de metano na ausência de iões cálcio, em ensaios em reactor fechado.

No presente trabalho, se durante o período I, os lípidos fossem precipitados com os iões divalentes, (Ca^{2+} e Mg^{2+}), seria aplicada em RI uma menor carga orgânica efectiva, justificando assim os menores teores de AGV na corrente de saída relativamente a RII. Cada ião divalente fixa teoricamente duas moléculas de oleato. Atendendo a que o peso molecular do oleato é de 282 g/mole, cada mole de cálcio precipita 564 g de oleato.

Os valores da razão molar oleato/ $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ foram calculados considerando as contribuições do cálcio presente na água da torneira, (valor por excesso - 30 mg/L) e no leite e o magnésio adicionado nos macronutrientes (Tabela 5.4). Pode observar-se que, durante o período I todo o oleato poderia teoricamente ter sido precipitado com os iões divalentes presentes. No entanto, a partir do dia 272 a concentração de oleato alimentada, excedeu a razão molar estequiométrica 2, relativamente aos iões divalentes e no último período de operação atingiu-se um máximo de 7.7 moles de oleato/moles de $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$. Contudo, não há evidência de que o oleato alimentado após esse dia tenha sido efectivamente biodegradado e só a análise do metano produzido teria sido elucidativa acerca deste ponto. No entanto, dadas as características do desenho dos digestores, não foi possível a recolha e análise do biogás, pois este escapava-se pelo rolamento que sustentava o veio do agitador (Figura 4.1).

Tabela 5.4 Razão molar oleato/(Ca²⁺ +Mg²⁺) alimentada ao longo da operação.

tempo, dias	Razão molar oleato/(Ca ²⁺ +Mg ²⁺)	
	RI	RII
0-29	-	-
29-71	-	-
71-76	0.50±0.01	-
76-90	0.54±0.01	-
90-114	0.82±0.01	-
114-132	0.71±0.05	-
132-162	1.10±0.01	-
162-212	1.25±0.01	-
212-272	1.04±0.01	1.04±0.01
272-294	2.10±0.01	2.09±0.01
294-333	4.27±0.04	4.26±0.03
333-363	5.46±0.02	5.49±0.02
363-426	7.79±0.08	7.73±0.04

Há evidências na literatura de que o oleato pode ser adsorvido na biomassa e que a sua biodegradação não é fácil. Por exemplo, SAYED *et al.* (1987), ao estudarem o tratamento anaeróbio de um efluente com lípidos, concluíram que o rendimento em metano era baixo, havendo uma discrepância entre a remoção de CQO solúvel e a produção de metano. RINZEMA (1988) observou a acumulação de AGCL adsorvidos na biomassa, afectando o transporte de substratos e produtos. Este facto tinha já sido referido por HANAKI *et al.* (1981) que concluíram que os AGCL produzidos pela hidrólise dos lípidos, aderiam à biomassa em 24 horas. Recentemente HWU (1997) estudou a adsorção de ácido oleico na biomassa granular, tendo concluído que, após a adsorção, existia uma dessorção, induzida, segundo o autor, pela produção e libertação do biogás. Neste trabalho serão apresentados dados experimentais que comprovam a encapsulação da biomassa pelo oleato no último período de operação.

5.4.2 Distribuição e crescimento da biomassa no suporte

A biomassa desenvolvida em RI e RII foi caracterizada ao fim de seis períodos de operação, sumariados na Tabela 5.5. A caracterização foi realizada em termos dos seguintes parâmetros: (i) distribuição entre as fracções aderida e oclusa na matriz de suporte; (ii) actividade metanogénica acetoclástica, hidrogenofílica, em propionato, butirato e etanol; (iii) toxicidade do oleato de sódio sobre as bactérias metanogénicas acetoclásticas e (iv) capacidade de biodegradação do oleato.

Tabela 5.5 Condições operatórias nos momentos da caracterização da biomassa.

Período	dia	CQO à entrada (mg/L)	TRH (dias)	<u>Tipo de substrato</u>	
				RI	RII
I	90	3000	0.92	leite gordo	leite magro
I	132	6000	1.38	leite gordo	leite magro
I	162	9000	1.38	leite gordo	leite magro
I	212	12000	1.38	leite gordo	leite magro
II	315	12000	1.38	leite magro + 2400 mg oleato de sódio/L	leite magro + 2400 mg oleato de sódio/L
III	426	12000	1.38	oleato de sódio (4150 mg/L)	oleato de sódio (4150 mg/L)

A biomassa considerada neste estudo refere-se apenas à fracção retida no suporte, não sendo considerada a biomassa acumulada na parte inferior do digestor (secção I do digestor, Figura 4.1, página 239). Embora essa biomassa seja importante para a eficiência do sistema, o objectivo do presente estudo foi avaliar a colonização do suporte pela biomassa e qual o efeito dos lípidos e do ácido oleico na cinética da colonização.

Na Tabela 5.6 estão registados os valores da biomassa aderida, oclusa e total de RI e RII durante todo o período de operação. Tal como pode ser observado, exceptuando o primeiro ponto do período I, a presença de lípidos induziu uma menor concentração de biomassa aderida, sendo observado em RII um biofilme mais denso (em termos de gSV/m²) e visivelmente mais espesso. Além disso, a diferença entre a concentração de biomassa aderida em RII (sem lípidos) e em RI (com lípidos) aumentou com o aumento da

carga orgânica e da concentração de lípidos, atingindo um valor máximo cerca de 4 vezes superior, no fim do período I de operação. Embora não tenha sido obtido o valor de biomassa aderida para RI durante o período II, é claro que no período III em que o oleato era a única fonte de carbono, a diferença entre a concentração de biomassa aderida em RI em RII foi reduzida para apenas mais 24% em RII do que em RI. Além disso, pode observar-se que o biofilme em RI foi crescendo continuamente, atingindo um máximo de 5.3 gSV/m² e que a alteração da composição do substrato alimentado, passando gradualmente de leite gordo para oleato induziu a formação de um biofilme cerca de 4 vezes mais denso neste digestor.

Tabela 5.6 Biomassa aderida, oclusa e total em RI e RII \pm intervalo com 95% de confiança. (diferença percentual positiva entre RI e RII).

Período	dia	biomassa aderida (gSV/m ²)		Biomassa oclusa (gSV/L vazio da matriz)		Biomassa total gSV/L reactor)	
		RI	RII	RI	RII	RI	RII
I	90	0.9 \pm 0.1 (+80%)	0.5 \pm 0.1	1.67 \pm 0.1 (+178%)	0.6 \pm 0.1	1.2 \pm 0.1 (+200%)	0.4 \pm 0.1
I	132	1.0 \pm 0.2	1.4 \pm 0.2 (+40%)	2.6 \pm 0.1 (+160%)	1.0 \pm 0.1	1.6 \pm 0.1 (+100%)	0.8 \pm 0.1
I	162	1.1 \pm 0.1	2.8 \pm 0.3 (+154%)	3.9 \pm 0.1 (+77%)	2.2 \pm 0.1	2.6 \pm 0.1 (+44%)	1.8 \pm 0.1
I	212	1.4 \pm 0.1	5.5 \pm 0.3 (+293%)	4.8 \pm 0.2 (+128%)	2.1 \pm 0.1	3.2 \pm 0.1 (+45%)	2.2 \pm 0.1
II	315	-(*)	14.0 \pm 1.6 -	7.8 \pm 0.1 (+66%)	4.7 \pm 0.1	4.9 \pm 0.1 (**)	5.1 \pm 0.3 (+4%)
III	426	5.3 \pm 0.1	6.6 \pm 0.2 (+24%)	15.4 \pm 0.7 (+50%)	10.3 \pm 0.4	10.3 \pm 0.4 (+39%)	7.4 \pm 0.3

(*) não determinada; (**) apenas biomassa oclusa

Em RII, a adição de oleato como única fonte de carbono alterou profundamente o biofilme pré existente, tendo-se verificado que mais de 50% foi removido do suporte. Conclui-se que o biofilme formado na presença de lípidos (RI), embora com menor concentração de sólidos por unidade de superfície, foi mais resistente à presença de oleato do que o biofilme formado na ausência de lípidos (RII).

O comportamento da biomassa oclusa foi o inverso tendo-se verificado uma maior concentração em RI do que em RII. As diferenças variaram entre 77 e 178% durante o período I e diminuíram, tal como esperado, nos períodos II e III. Relativamente à biomassa total acumulada, verificou-se que, com a excepção do período II em que os valores foram muito próximos, RI reteve mais biomassa no suporte do que RII. Dois efeitos antagónicos podem justificar este facto. Por um lado, a alimentação com o substrato lipídico pode ter diminuído a densidade e a velocidade de sedimentação da biomassa depositada na secção inferior do digestor, devido à adsorção de lípidos, conduzindo a um maior fluxo de biomassa para a secção da matriz de suporte. Por outro lado, a distribuição da biomassa no suporte foi também afectada no sentido de uma maior proporção de biomassa oclusa, que induz um maior “*washout*”, tal como verificado na Figura 5.12.

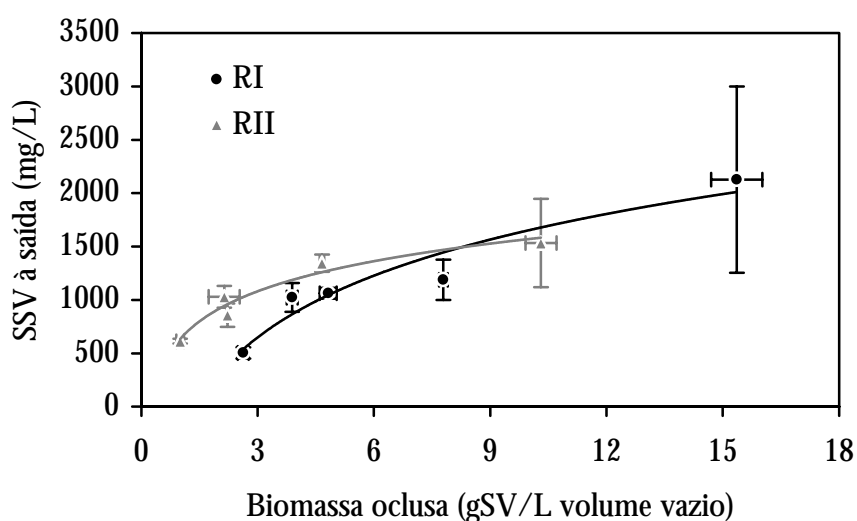


Figura 5.12 Efeito da biomassa oclusa na concentração de biomassa à saída de RI e RII.

A distribuição da biomassa na matriz de suporte em ambos os digestores está evidenciada na Figura 5.13 onde se representa a fracção de biomassa aderida em termos percentuais relativamente à biomassa total retida. Durante o período I, a fracção de biomassa aderida aumentou até cerca de 40% em RII, e em RI permaneceu em valores baixos, tendo decrescido entre 11.8% e 6.6%.

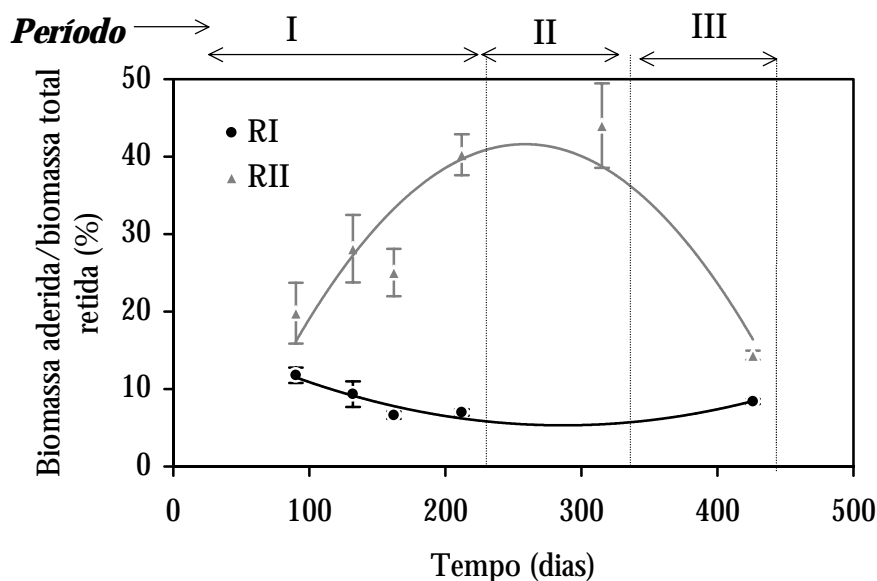


Figura 5.13 Evolução da fracção de biomassa aderida em RI e RII.

Após introdução de oleato na alimentação (Períodos II e III) a fracção de biomassa aderida de RII aproximou-se da de RI, tendo decrescido de 40 para 14% entre o período II e o período III, enquanto que em RI não houve variações apreciáveis.

Convém salientar que os valores de sólidos voláteis devem ser analisados com reservas, dado que representam toda a matéria orgânica, incluindo possível oleato adsorvido na biomassa. De facto há várias evidências de que, em particular no período III a biomassa se encontrava encapsulada por uma matéria esbranquiçada, supostamente oleato. A primeira evidência provém dos valores dos rendimentos biomassa-substrato calculados para RI e RII durante o período experimental. Considerando o digestor perfeitamente agitado, em estado estacionário no que diz respeito à fase líquida e em estado não estacionário para a fase sólida, pode escrever-se:

$$\frac{dx_R}{dt} = \mu x_R - \frac{x_S}{TRH} \quad (5.3)$$

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{\mu x_R}{y_{x/S}} + \frac{S_0 - S}{TRH} = 0 \quad (5.4)$$

em que:

x_R é a concentração de sólidos voláteis na matriz de suporte (mg SV/L)

x_S é a concentração de sólidos voláteis na corrente de saída (mg SV/L)

S_0 é a concentração de substrato à entrada, (mg CQO/L)

S é a concentração de substrato na corrente de saída (mg CQO/L)

μ é a taxa específica de crescimento da biomassa, (dia⁻¹)

$Y_{x/S}$ é o rendimento médio biomassa/substrato (mg SV/mg CQO removido)

TRH é o tempo de retenção hidráulico (dias).

$\frac{dx_R}{dt}$ representa a variação da biomassa total retida com o tempo (mg SV/L.dia)

$\frac{dS}{dt}$ representa a variação da concentração de saída com o tempo, considerada nula por se admitir estado estacionário para a fase líquida (mg CQO/L.dia).

Os valores de $Y_{x/S}$ e μ podem calcular-se pelas equações 5.3 e 5.4 que, rearranjadas, tomam as formas:

$$Y_{x/S} = \frac{\left(\frac{dx_R}{dt} + \frac{x_S}{\text{TRH}} \right)}{S - S_0} \times \text{TRH} \quad (5.5)$$

$$\mu = \frac{1}{x_R} \left(\frac{dx_R}{dt} + \frac{x_S}{\text{TRH}} \right) \quad (5.6)$$

Os valores de $\frac{dx_R}{dt}$ foram obtidos pelo declive da concentração de biomassa total no reactor em função do tempo (Figura 5.14)

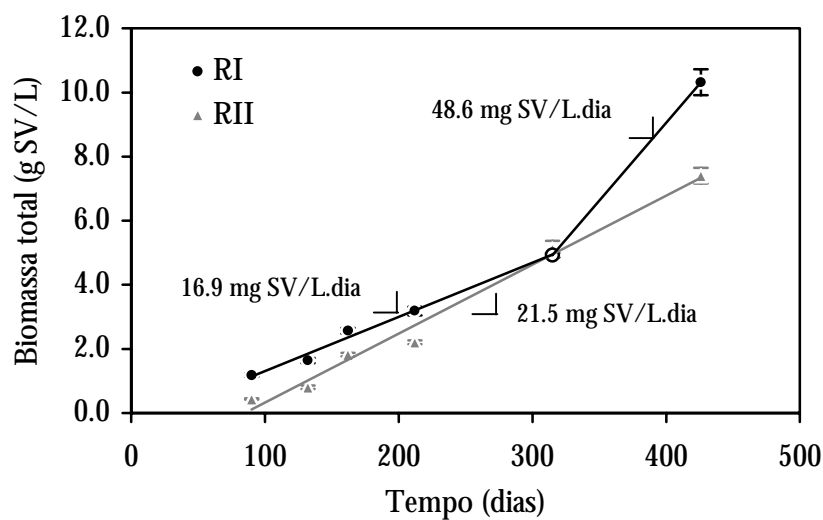


Figura 5.14 Biomassa total retida no suporte de RI e RII ao longo do tempo de operação.

No caso de RII, este valor foi constante e igual a 21.5 mg SV/L.dia. No caso de RI, considerou-se este valor constante e igual a 16.9 mg SV/L.dia até ao fim do período II (dia 363) e, entre o período II e o período III, considerou-se um valor de 48.6 mgSV/L.dia.

Na Tabela 5.7 estão representados os valores das taxas específicas de crescimento e dos rendimentos biomassa/substrato calculados de acordo com as equações 5.6 e 5.5, respectivamente.

Tabela 5.7 Taxas específicas de crescimento e rendimentos biomassa/substrato ao longo do período de operação (\pm intervalo com 95% de confiança).

Período	dia	μ (dia ⁻¹)		Y _x /S (mg SV/mg CQO)	
		biomassa de RI	biomassa de RII	biomassa de RI	biomassa de RII
I	114	0.50 (± 0.10)	1.23 (± 0.12)	0.13 (± 0.02)	0.15 (± 0.01)
I	132	0.27 (± 0.03)	0.65 (± 0.23)	0.09 (± 0.01)	0.12 (± 0.01)
I	162	0.36 (± 0.04)	0.49 (± 0.06)	0.12 (± 0.01)	0.11 (± 0.01)
I	212	0.27 (± 0.01)	0.21 (± 0.02)	0.10 (± 0.01)	0.11 (± 0.01)
II	272	0.21 (± 0.03)	0.27 (± 0.03)	0.11 (± 0.02)	0.12 (± 0.01)
II	294	0.22 (± 0.03)	0.28 (± 0.01)	0.11 (± 0.02)	0.12 (± 0.01)
II	333	0.13 (± 0.02)	0.12 (± 0.02)	0.11 (± 0.02)	0.09 (± 0.02)
II	363	0.15 (± 0.02)	0.08 (± 0.05)	0.14 (± 0.03)	0.08 (± 0.02)
III	426	0.25 (± 0.05)	0.15 (± 0.02)	0.26 (± 0.06)	0.14 (± 0.04)

Estes valores podem ser comparados com valores da literatura, registados na Tabela 5.8. Com excepção do último valor de rendimento, é de salientar a concordância entre os presentes valores e os da literatura. Por exemplo HANAKI *et al.* (1994), encontraram valores entre 0.10 e 0.15 mg SV/mg CQO removido, para a biomassa dum filtro anaeróbio laboratorial e ANGELIDAKI E AHRING (1995) obtiveram uma taxa específica máxima de crescimento de 0.3 dia⁻¹ para uma cultura enriquecida em bactérias acetogénicas consumidoras de AGCL. Os valores obtidos para os rendimentos biomassa/substrato no último período de operação, especialmente no caso de RI foram significativamente superiores aos previstos, com base na literatura, o que pode ser justificado pela já referida adsorção de oleato na biomassa.

Tabela 5.8 Taxas específicas máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e rendimentos biomassa/substrato ($Y_{\text{x/S}}$). Valores da literatura.

Tipo de substrato	Processo	$\mu_{\text{máx}}$ (dia^{-1})	$Y_{\text{x/S}}$ (mg SV/mg CQO rem)	Referência
Hidratos de carbono	acidogénese	7.2-30	0.14-0.17	PAVLOSTATHIS E GIRALDO-GOMEZ (1991)
AGCL	oxidação anaeróbia	0.085-0.55	0.04-0.11	“
AGV excepto acetato	oxidação anaeróbia	0.13-1.20	0.025-0.047	“
acetato	metanogénese acetoclástica	0.08-0.70	0.01-0.054	“
H_2/CO_2	metanogénese	0.05-4.07	0.017-0.045	“
Glucose	global	-	0.141	HANAKI <i>et al.</i> , 1994
Acetato	metanogénese	-	0.039	“
Efluente lácteo	global	-	<0.18	LETTINGA <i>et al.</i> , 1980
AGCL	oxidação anaeróbia	0.3	-	ANGELIDAKI E AHRING (1995)

5.4.3 Evolução da actividade metanogénica de diferentes grupos tróficos do consórcio

A biomassa oclusa desenvolvida em ambos os digestores, retirada nos tempos definidos na Tabela 5.5, foi caracterizada em termos de actividades metanogénicas específicas relativamente a substratos directos da metanogénese (acetato e H_2/CO_2) e indirectos (propionato, butirato e etanol). A biomassa retirada no dia 114 permaneceu cerca de um mês armazenada a 4 °C, antes da realização dos testes de actividade, enquanto que todas as outras amostras foram analisadas imediatamente após a sua recolha dos digestores. Assim, os valores referentes ao dia 114 devem ser interpretados com algumas reservas. Na Figura 5.15 estão representadas as actividades metanogénicas acetoclástica e hidrogenofílica ao longo do período operativo.

Estas actividades foram muito semelhantes em RI e em RII, durante todo o período de operação incluindo o período I, em que eram alimentados lípidos no reactor RI.

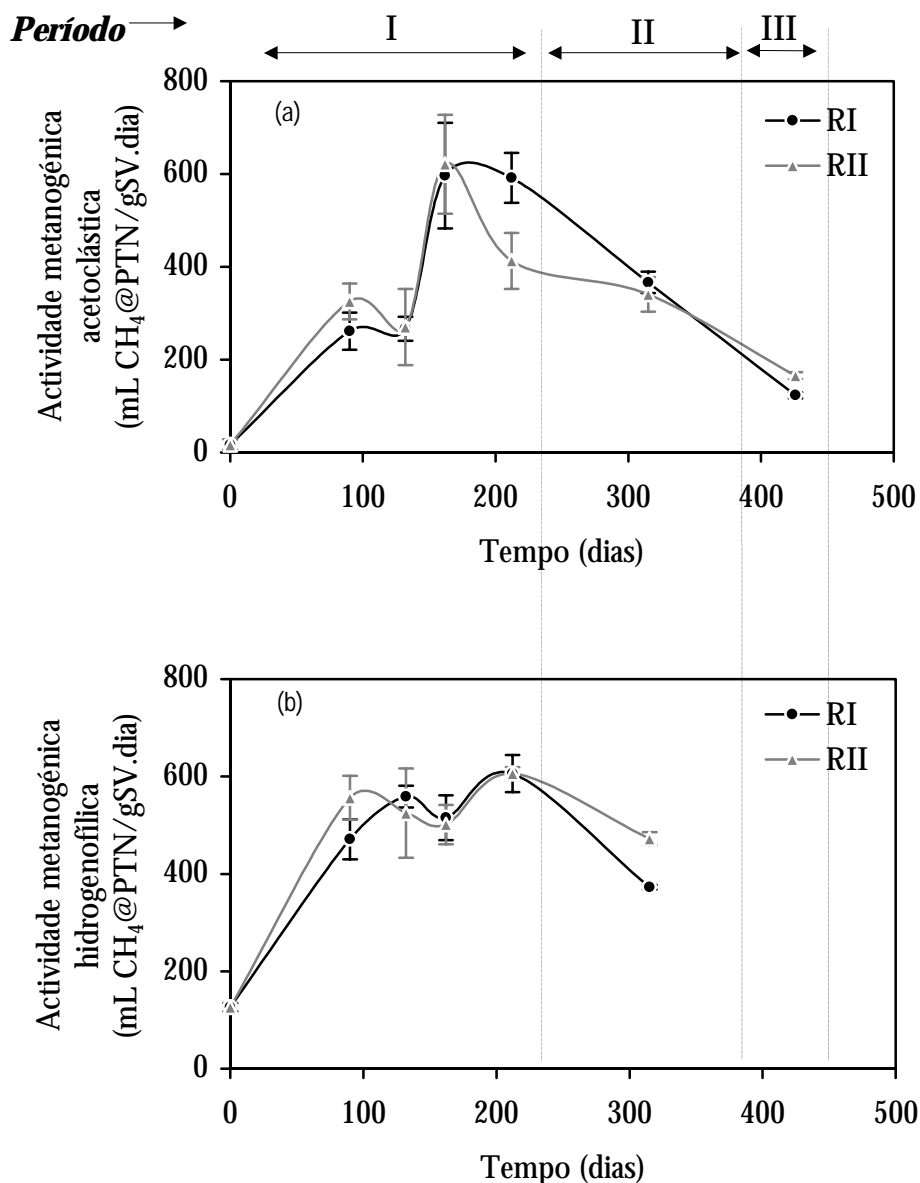


Figura 5.15 Evolução da actividade metanogénica acetoclástica (a) e hidrogenofílica (b) em RI e RII.

A actividade acetoclástica atingiu máximos evidentes de 597 ± 114 e 621 ± 107 mL CH₄@PTN/gSV.dia, respectivamente em RI e RII, no dia 162 de operação. Após a introdução de oleato na alimentação, verificou-se um decréscimo acentuado da actividade acetoclástica, atingindo valores de 366 ± 23 e de 340 ± 37 mL CH₄@PTN/gSV.dia, no período II e de 123 ± 69 e 165 ± 7 mL CH₄@PTN/gSV.dia, no período III em RI e RII respectivamente. É de salientar que os valores obtidos no dia 114, especialmente para a actividade acetoclástica, apresentaram um valor inferior à tendência demonstrada pela curva,

o que é atribuído ao já referido armazenamento durante um mês a 4 °C, antes da realização dos testes de actividade.

A actividade metanogénica hidrogenofílica, que mede a actividade de um grupo importante de bactérias que actuam sintroficamente com as bactérias acetogénicas, produtoras obrigatórias de hidrogénio (STAMS, 1994), foi também muito semelhante para RI e RII durante todo o período operativo.

A possibilidade de precipitação dos lípidos com os iões divalentes da alimentação durante o período I, pode ter eliminado o seu efeito na actividade do consórcio, justificando a similaridade de valores entre RI e RII. Por outro lado, não se verificou qualquer influência da pré-exposição a lípidos na actividade acetoclástica após a adição de oleato. No caso da actividade hidrogenofílica notou-se mesmo que em RII, que não tinha sido exposto previamente a lípidos, esta actividade foi ligeiramente superior do que em RI quando se introduziu oleato.

Comparando a actividade acetoclástica com a hidrogenofílica conclui-se que a primeira aumentou mais lentamente e diminuiu mais rapidamente do que a segunda, tendo-se esta mantido durante mais tempo nos valores máximos. Enquanto que a actividade acetoclástica começou a decrescer ainda no período I, antes de adicionar oleato, a actividade hidrogenofílica só decresceu quando se introduziu oleato na alimentação. No período III, no entanto, não foram obtidos valores para a actividade hidrogenofílica.

ANGELIDAKI E AHRING (1992) sugeriram que a resposta dum consórcio microbiano anaeróbio à adição de lípidos pode depender do grau de adaptação aos lípidos, mas que a adição directa de AGCL resultava em inibição do processo. Segundo estas autoras, a adaptação a lípidos resulta do desenvolvimento de uma população acetogénica capaz de degradar os AGCL, à medida que se vão formando, evitando a sua acumulação até concentrações inibitórias.

O efeito do oleato na actividade metanogénica específica resulta da combinação de dois fenómenos independentes: por um lado o efeito inibitório que afecta o metabolismo celular e por outro lado a adsorção na parede celular que faz aumentar os valores de sólidos voláteis. Ambos os efeitos actuam sinergicamente, fazendo baixar a actividade

metanogénica específica, directa ou indirectamente. HANAKI *et al.* (1981) concluíram que os AGCL afectam as bactérias acetogénicas da β -oxidação e as metanogénicas, que convertem os produtos da β -oxidação em metano. Verificaram contudo que a pressão parcial de hidrogénio permanecia sempre em níveis baixos, sugerindo que as acetogénicas são mais afectadas do que as hidrogenofílicas pelos AGCL.

No presente trabalho foram determinadas actividades metanogénicas em substratos indirectos para a metanogénese tais como propionato, butirato e etanol, cujo objectivo foi avaliar a evolução do grupo de bactérias sintróficas que degradam estes substratos a hidrogénio e acetato (Figura 5.16). Como estes substratos são substratos indirectos para a metanogénese, a medida destas actividades em termos de metano só representa a actividade das bactérias que consomem cada um desses substratos, no caso das actividades a jusante do processo (acetoclástica e hidrogenofílica) não serem limitativas (DOLFING E BLOEMEN, 1985). No caso presente essa condição foi verificada para todas as amostras de biomassa. Devido a insuficiência da quantidade de biomassa, não se analisaram estas actividades na biomassa retirada no dia 90.

A actividade metanogénica em propionato da biomassa RII apresentou um máximo no fim do período I, tendo decrescido acentuadamente no período II. A biomassa de RI mostrou uma tendência estável desde o dia 132 até ao fim do período I, que foi persistente após a introdução de oleato na alimentação. É de considerar a hipótese das bactérias consumidoras de propionato de RI terem ganho alguma resistência pelo contacto com os lípidos.

É relevante o estímulo na actividade em butirato em RI relativamente a RII (Figura 5.16 (b)). O butirato é um dos intermediários da β -oxidação de ácidos gordos de cadeia longa com número par de carbonos (WENG E JERIS, 1976). O facto da actividade em butirato ter sido estimulada em RI pode significar uma maior capacidade de β -oxidação da biomassa deste reator, relativamente a RII. Este resultado está de acordo com RINZEMA *et al.* (1994) que sugeriram que uma concentração baixa de AGCL ou lípidos na alimentação promove o crescimento das bactérias acetogénicas da β -oxidação.

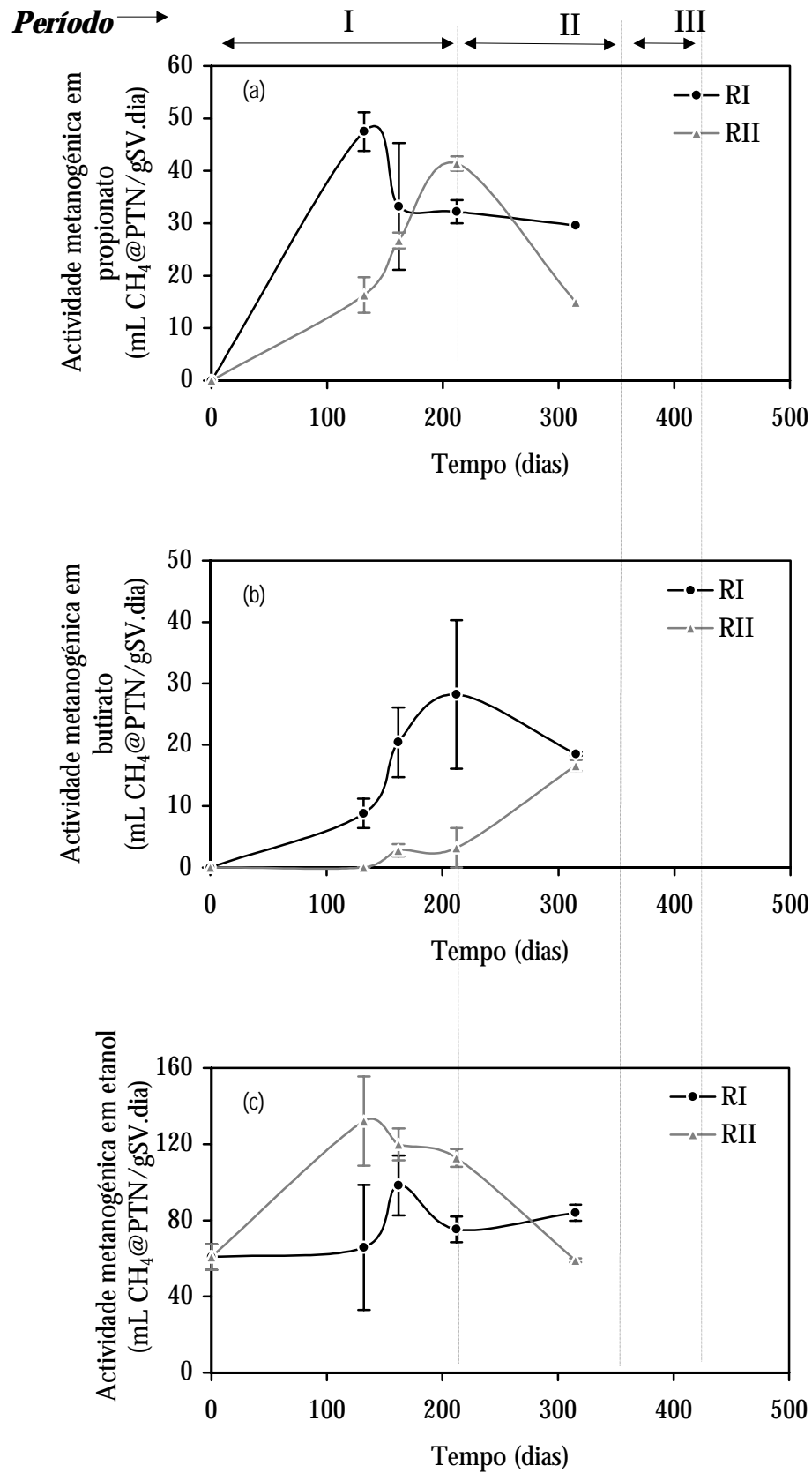


Figura 5.16 Evolução da actividade metanogénica em propionato (a), butirato (b) e etanol (c) em RI e RII.

Após a introdução de oleato na alimentação (Período II), a actividade em butirato em RII aumentou significativamente, tendo-se aproximado do valor da biomassa de RI que no mesmo período de operação sofreu um decréscimo. O valor da actividade em butirato após a adição de oleato foi independente de se ter ou não exposto a biomassa a lípidos. A actividade metanogénica em etanol foi persistentemente inferior em RI do que em RII durante o período I, sugerindo que este grupo de bactérias foi inibido pela presença dos lípidos. Quando se adicionou oleato directamente a ambos os digestores a actividade em etanol de RI manteve-se estacionária e a de RII decresceu acentuadamente, indicando uma maior sensibilidade desta biomassa ao oleato.

5.4.4 Evolução da toxicidade do ácido oleico sobre as bactérias metanogénicas acetoclásticas

Antes de decidir escolher as bactérias acetoclásticas para os ensaios de toxicidade, calculou-se o índice de toxicidade (IC_{50} - ver definição no **sub-Capítulo 5.3.4.3**, página 272) para as bactérias acetoclásticas e hidrogenofílicas do inóculo utilizado nos digestores. Os resultados desses ensaios de toxicidade estão representados na Figura 5.17.

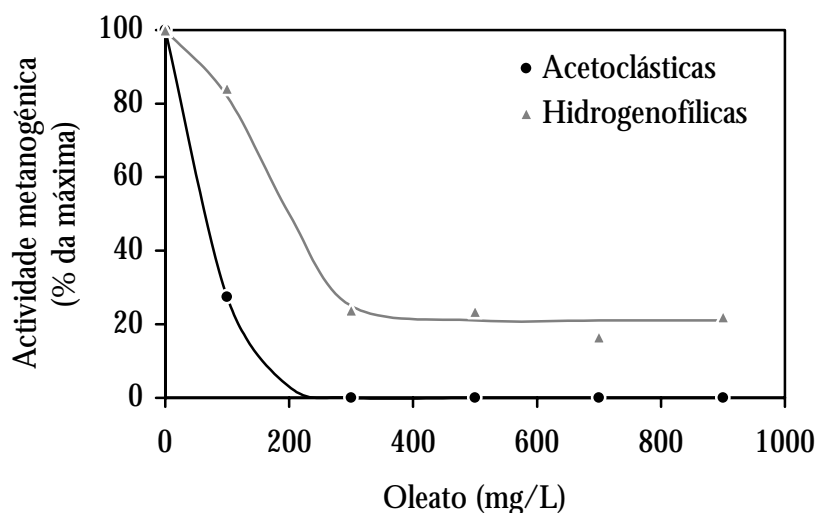


Figura 5.17 Toxicidade do oleato de sódio sobre as bactérias metanogénicas acetoclásticas e hidrogenofílicas presentes no inóculo.

Os valores do IC_{50} obtidos foram 50 mg oleato/L para as bactérias acetoclásticas e 200 mg oleato/L para as bactérias hidrogenofílicas. Este resultado está de acordo com HANAKI *et*

al. (1981) que observaram que a inibição das bactérias acetogénicas e acetoclásticas pelos AGCL se manifestava pelo aparecimento de uma longa fase de latência (200-400 horas), enquanto que no caso das bactérias hidrogenofílicas apenas decrescia a taxa de conversão de hidrogénio.

A sensibilidade generalizada das bactérias acetoclásticas a condições adversas tem sido referida por vários autores (YANG E SPEECE, 1986, COLLERAN, comunicação pessoal, 1996). A escolha deste grupo trófico para os estudos de toxicidade foi baseada não só na sua grande sensibilidade à toxicidade do oleato, comprovada pelos resultados acima referidos, mas também pelo seu importante papel metabólico, evidenciado na Figura 2.1 (GUJER E ZEHNDER, 1983).

Um dos objectivos do presente trabalho era verificar se a tolerância das bactérias acetoclásticas ao oleato de sódio variava ao longo da operação e se a exposição a lípidos e oleato tinha algum efeito nessa variação. A biomassa desenvolvida em RI (alimentado inicialmente com lípidos) foi comparada com a biomassa de RII (alimentado sem lípidos) em termos de resistência à toxicidade do oleato, medida pelo índice de toxicidade IC_{50} (Figura 5.5). Durante o período I, realizaram-se 4 testes de toxicidade à biomassa retirada de ambos os digestores nos dias 90, 132, 162 e 212, correspondentes às condições operatórias definidas na Tabela 5.5. As diferenças entre a biomassa de RI e de RII foram-se acentuando ao longo deste período de operação. De um modo geral, a biomassa de RI apresentava uma fase de latência que precedia a produção de metano. A duração dessa fase de latência era variável com a concentração de oleato adicionada e, para concentrações inferiores a 300 mg oleato/L era desprezável. Após a fase de latência o oleato e o acetato eram virtualmente degradados em simultâneo. Na Figura 5.18 está representada a produção de metano (por unidade de sólidos voláteis medidos no final do ensaio) ao longo do tempo, num teste de toxicidade para a biomassa retirada de RI nos dias 162 e 212. Por comparação das duas curvas pode verificar-se que as fases de latência diminuíram.

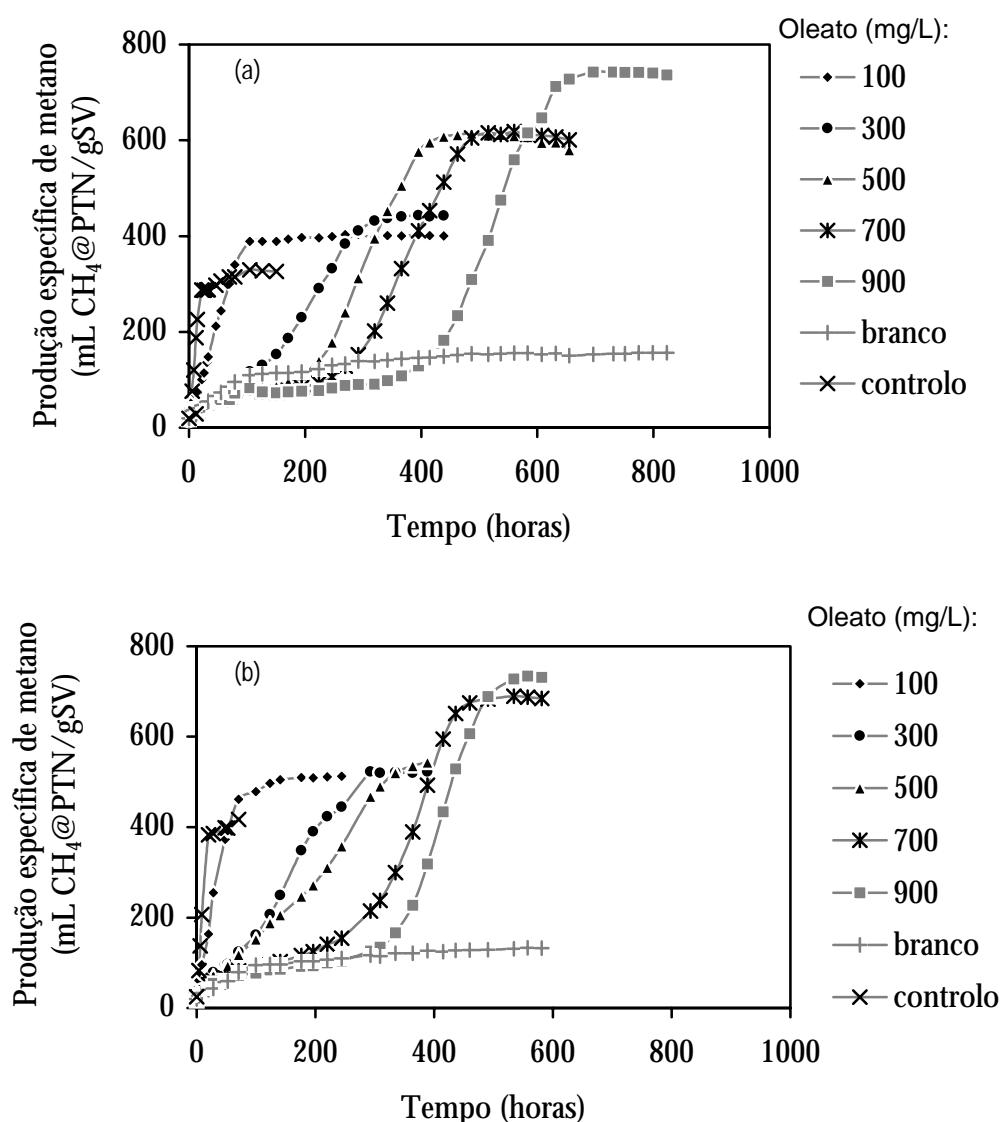


Figura 5.18 Produção específica de metano durante um teste de toxicidade (biomassa retirada de RI nos dias 162 (a) e 212 (b)).

Nas primeiras caracterizações do dia 90 e 132, a biomassa de RII apresentou um comportamento semelhante à de RI, mas a partir do dia 162 começou a ter um comportamento diferente, do tipo diáuxico, que se acentuou até ao fim do período I. Na Figura 5.19 está representada a produção de metano num teste de toxicidade à biomassa de RII nos dias 162 e 212 de operação. A velocidade inicial de produção de metano foi consideravelmente superior à verificada para a biomassa de RI, não tendo sido observada fase de latência. A produção de metano correspondente ao primeiro patamar parece ser

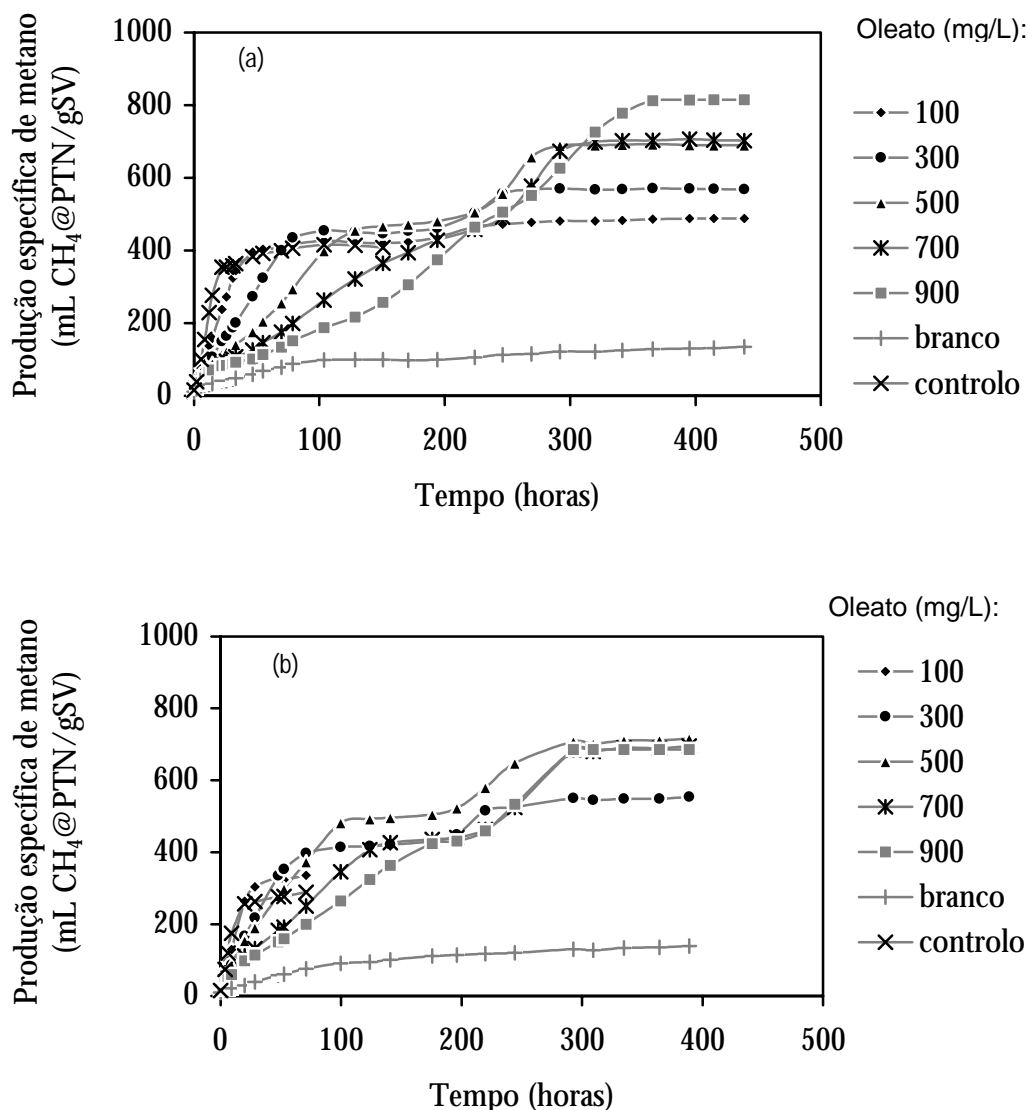


Figura 5.19 Produção específica de metano durante um teste de toxicidade (biomassa retirada de RII nos dias 162 (a) e 212 (b)).

devida à degradação de acetato, sendo o oleato degradado posteriormente. Na Figura 5.20 está evidenciado este aspecto para a biomassa retirada no dia 162.

Enquanto que a produção de metano correspondente ao primeiro patamar quase não variou com a concentração de oleato adicionado ao frasco do teste, a diferença entre o 2º e o 1º patamar, correspondente à 2ª produção de metano observada nas curvas da Figura 5.19 (a), aumentou linearmente com a concentração de oleato adicionada, parecendo indicar que

o oleato adicionado foi degradado a metano, pelo menos parcialmente. Para a biomassa retirada no dia 212 os patamares observados para a produção de metano não estão tão definidos (Figura 5.19 (b)), permanecendo a dúvida sobre se esse facto é devido a erros experimentais decorrentes da adição do substrato e do inibidor nos frascos, ou a uma diferente sequência de degradação.

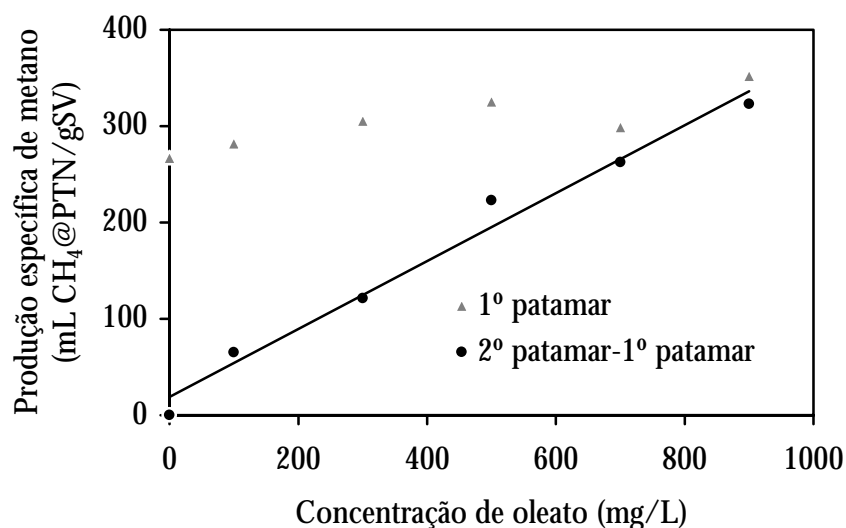


Figura 5.20 - Evidência do comportamento diáuxico da biomassa retirada de RII no dia 162.

Dado que se pretende avaliar a toxicidade do oleato sobre as bactérias metanogénicas acetoclásticas deve-se, de facto, medir a velocidade inicial de produção de metano correspondente à degradação do acetato, antes do oleato ser degradado. No entanto não foi provado que tal tenha sido verificado em todos os ensaios. Comparando a Figura 5.18 com a Figura 5.19 torna-se claro que a biomassa de RII tem uma maior actividade metanogénica inicial e que na biomassa de RI há um atraso na produção inicial de metano que pode ser devido a limitações difusionais de substrato e produtos, eventualmente por adsorção de lípidos na biomassa. No entanto, este efeito deveria também ter sido evidenciado nos valores da actividade metanogénica específica, o que não aconteceu (Figura 5.15 (a)).

Os valores do índice de toxicidade, que estão representados na Figura 5.21 ao longo do tempo de operação, reflectem a tendência da biomassa de RI ser menos resistente à presença de oleato do que a de RII. De facto, durante o período I, a tolerância da biomassa

de RII ao oleato aumentou acentuadamente e a da biomassa de RI aumentou apenas muito ligeiramente, sendo a diferença de comportamento atribuída à presença de lípidos na alimentação de RI. Não era esperado que a presença de lípidos aumentasse a susceptibilidade da biomassa à toxicidade do oleato, nem que a biomassa de RII mostrasse uma crescente tolerância a essa toxicidade. No entanto, após substituição da alimentação de cada reactor para uma mistura de leite magro e oleato (Período II), a biomassa de RII tornou-se mais susceptível ao oleato do que a biomassa de RI, que atingiu um máximo de tolerância nesse período, sugerindo que o tipo de resistência ao oleato desenvolvida pelas duas biomassas foi diferente.

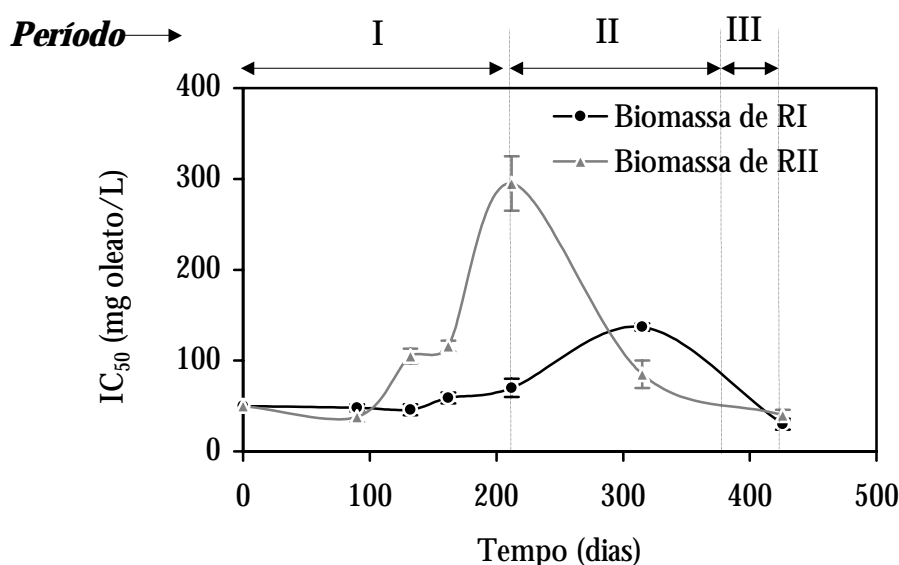


Figura 5.21 Índice de toxicidade do oleato de sódio sobre as bactérias metanogénicas acetoclásticas. Evolução ao longo do tempo de operação.

Embora a biomassa de RII apresente uma crescente resistência à toxicidade do oleato durante o período I em que foi alimentada com um substrato facilmente degradável, não mostrou ter capacidade de resistir a esse tóxico quando este foi introduzido na alimentação. Por outro lado, embora a biomassa de RI mostrasse ao longo do período I uma reduzida tolerância à toxicidade do oleato, quando este foi introduzido na alimentação essa biomassa mostrou um acréscimo de tolerância à sua toxicidade, sendo nesse período superior à de RII. Este resultado sugere que, para o tratamento de um efluente com oleato de sódio (e

eventualmente com misturas de AGCL) é benéfico expor a biomassa a lípidos no sentido de desenvolver tolerância aos AGCL. Esse acréscimo de tolerância pode ser interpretado como um efeito de adaptação.

Quando se eliminou o co-substrato da alimentação de ambos os digestores, passando a ser constituída por oleato como única fonte de carbono com uma concentração de 4150 mg/L (12 000 mg CQO/L), a resistência ao oleato praticamente desapareceu em ambas as biomassas sendo previsível que nessas condições não haja possibilidade de resistência a choques orgânicos.

A adaptação das bactérias metanogénicas aos AGCL tem sido questionada por vários autores. A maior parte da literatura refere-se a testes rápidos em reactor fechado (HANAKI *et al.*, 1981, ANGELIDAKI E AHRING, 1992, KOSTER E CRAMER, 1987) e a conclusão geral é que não ocorre adaptação. ANGELIDAKI E AHRING (1992) referem que não houve adaptação à toxicidade após pré-exposição a concentrações sub-tóxicas, nem houve recuperação da actividade após diluição de concentrações tóxicas. É frequente o uso de termos como “efeito bactericida” e “citólise” para referir o efeito dos AGCL sobre a biomassa anaeróbia (RINZEMA *et al.*, 1994, HWU, 1997). Contudo, julgou-se ser interessante avaliar o comportamento da biomassa na presença destes compostos numa escala de tempo dilatada, mais compatível com os tempos de operação de reactores reais e provou-se haver um efeito de adaptação, medido pelo aumento do índice de toxicidade (IC₅₀).

Há vários factores que afectam a toxicidade dos AGCL. A temperatura, o tipo de biomassa e a presença de sais de cálcio e magnésio são considerados dos mais relevantes. Tendo em conta esses factores, pode observar-se que os valores de IC₅₀ obtidos no presente trabalho estão de acordo com os referidos na literatura (Tabela 5.9).

KOSTER E CRAMER (1987) obtiveram um valor de IC₅₀ superior ao obtido por HWU *et al.* (1996) para a biomassa retirada do mesmo digestor (da indústria de processamento de batata “AVIKO”). Esta diferença é atribuída ao efeito do cálcio e da temperatura. Embora HWU *et al.* (1996 b) tenham considerado que o efeito do Ca²⁺ é de menor importância comparado com o efeito da temperatura, convém salientar que, teoricamente, 35 mg Ca²⁺/L podem precipitar 493 mg/L de oleato.

A área específica da biomassa é também considerada um factor que afecta a toxicidade do oleato. HWU *et al.* (1996 b) compararam a toxicidade do oleato para biomassa de várias origens e obtiveram um valor de IC₅₀ 13 vezes superior para biomassa granular do que para biomassa dispersa, tendo concluído que a biomassa suspensa era muito mais susceptível à toxicidade do oleato do que a biomassa granular (Tabela 5.9). Além disso, encontraram uma correlação entre o valor de IC₅₀ e a área específica da biomassa. O menor valor de IC₅₀ da Tabela 5.9 refere-se ao trabalho de HANAKI *et al.* (1983) obtido com lamas provenientes duma ETAR municipal, sem adição de Ca²⁺ ou Mg²⁺ nos ensaios de toxicidade. Os valores obtidos no presente trabalho variaram entre 30 e 295 mg/L e foram obtidos para biomassa suspensa, sem adição de Ca²⁺ ou Mg²⁺ nos ensaios de toxicidade e a 37 °C. A comparação com os outros valores da literatura deve ter em consideração estes factores.

Tabela 5.9 Toxicidade do oleato de sódio sobre as bactérias metanogénicas acetoclásticas. Exemplos da literatura e comparação com os valores obtidos neste trabalho.

origem da biomassa	Tipo de biomassa	Temperatura (°C)	Ca ²⁺ /Mg ²⁺	IC ₅₀ (mg/L)	referência
UASB/Processamento de batata (AVIKO)	granular	30	35 mg/L	1322	KOSTER E CRAMER, 1987
UASB/Processamento de batata (AVIKO)	granular	40	2.7 mg/L	690	HWU <i>et al.</i> , 1996
EGSB/leite gordo	suspensa	40	2.7 mg/L	79	HWU <i>et al.</i> , 1996
EGSB/leite gordo	granular	40	2.7 mg/L	1015	HWU <i>et al.</i> , 1996
ETAR municipal	suspensa	37	0	10	HANAKI <i>et al.</i> , 1983
Filtro alimentado c/ leite gordo	suspensa/floculenta	35	0	48-70	presente trabalho
Filtro alimentado c/ leite magro	suspensa/floculenta	35	0	38-295	presente trabalho
Filtro alimentado c/ oleato e co-substrato	suspensa/floculenta	35	0	85-137	presente trabalho
Filtro alimentado c/ oleato	suspensa/floculenta	35	0	30-40	presente trabalho

Os valores de IC_{50} obtidos para as biomassas de RI e RII parecem ter sido mais determinados pelas fases de latência que antecediam a produção de metano do que pela sua taxa de produção de metano. Na Figura 5.22 estão representados os valores das fases de latência observados para ambas as biomassas durante todo o período operatório e, por comparação com a Figura 5.21, é possível observar que há uma coincidência entre o máximo de IC_{50} e o mínimo de fase de latência para ambas as biomassas. Na biomassa de RII, as fases de latência decresceram durante o período I para todas as concentrações de oleato adicionado. Na biomassa de RI observou-se um decréscimo muito mais lento, registando-se, no dia 315 de operação, a ausência de fases de latência para todas as concentrações de oleato adicionado.

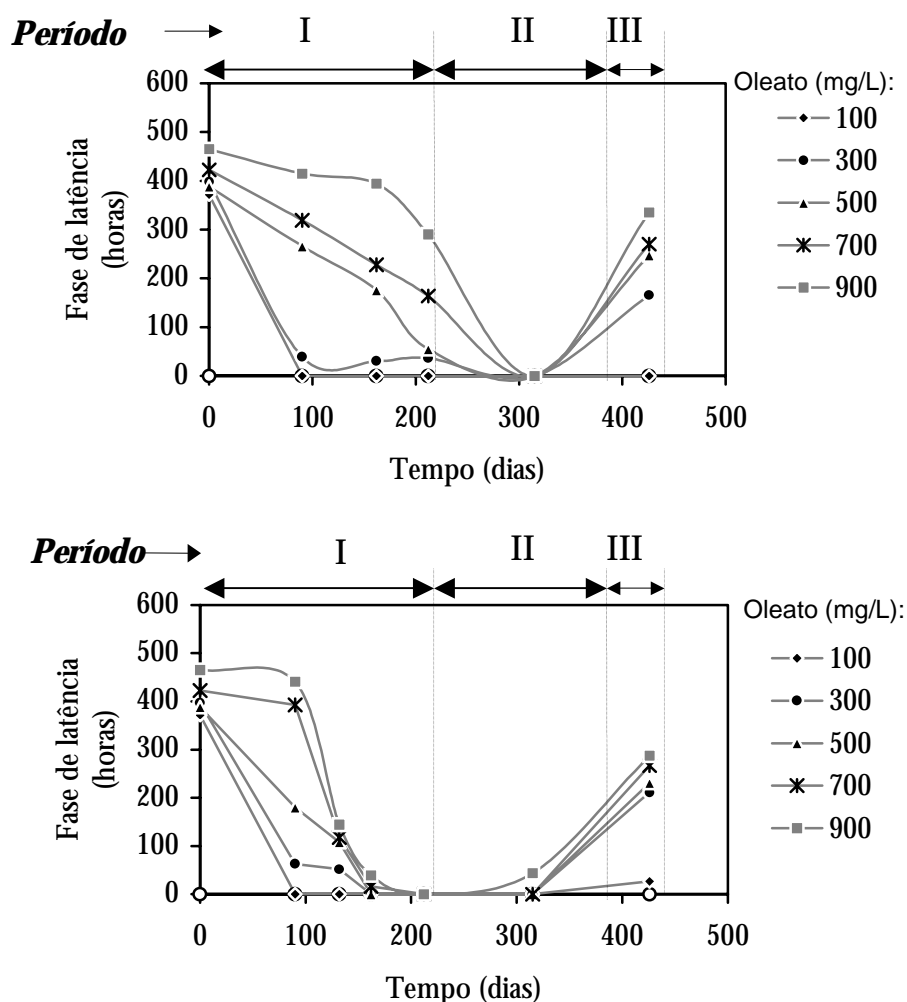


Figura 5.22 Evolução das fases de latência observadas nos testes de toxicidade da biomassa de RI (a) e de RII (b).

Nesse dia, o IC₅₀ foi máximo para essa biomassa. No último período de operação foi observado um aumento acentuado das fases de latência, a partir de 100 mg oleato/L, que se traduziram numa diminuição do IC₅₀ para ambas as biomassas (Figura 5.21).

Observando os valores da razão molar oleato/(Ca²⁺+Mg²⁺) (Tabela 5.4), constata-se que neste período de operação o valor estequiométrico 2 foi largamente excedido, estimando-se que grande parte do oleato possa ter sido retido por adsorção na biomassa. A verificar-se esta hipótese, a par do efeito inibitório que o oleato exerce sobre as bactérias acetoclásticas, a transferência de substratos e produtos seria afectada.

De facto, durante o período III de operação foi observada a acumulação de uma massa esbranquiçada na secção superior dos digestores que tinha o aspecto de uma espuma viscosa, mas que se verificou apresentar actividade metanogénica (Tabela 5.10).

Tabela 5.10 Actividade metanogénica em acetato, propionato, butirato e H₂/CO₂ da matéria esbranquiçada e viscosa acumulada no topo dos digestores RI e RII.

		Actividade metanogénica específica (mL CH ₄ @PTN/gSV.dia)			
substrato	→	acetato	propionato	butirato	H ₂ /CO ₂
RI		145.9±33.1	0	0	53.9±18.4
RII		150.1±24.1	0	0	122.1±12.9

Os valores da actividade metanogénica acetoclástica foram muito semelhantes aos obtidos para a biomassa oclusa nesse período (123.2±6.5 para RI e 165.4±7.3 para RII). Além disso não foi detectada actividade em butirato, sugerindo que estas bactérias, se presentes no digestor nesse período (a actividade em butirato não foi medida no período III) não eram especialmente afectadas pelo “washout”. Considerando a actividade em butirato como um indicador da actividade das bactérias acetogénicas envolvidas na β-oxidação, este facto parece estar em desacordo com o observado por HWU (1997). Com efeito este autor verificou existir uma maior capacidade de degradação de oleato nas pequenas partículas de biomassa que saíam na corrente de saída de um reactor EGSB do que na biomassa granular que permanecia dentro do reactor, tendo concluído que essas bactérias eram selectivamente arrastadas com a corrente de saída nessas condições operatórias.

Vários autores referem a encapsulação da biomassa anaeróbia com AGCL (RINZEMA, 1988, HANAKI *et al.* 1981, HWU, 1997). HWU (1997) estudou a biosorção do ácido oleico, relacionando-a com a flutuação da biomassa em reactores UASB. Mostrou que a adsorção do oleato é altamente dependente da concentração em ensaios em reactor fechado e que induzia a inibição das bactérias metanogénicas retardando a produção de metano. Em reactor UASB, este autor observou a flutuação completa da biomassa para uma carga mássica de 0.2 g CQO/gSV.dia de uma mistura de AGCL constituída por 35% de ácido palmítico, 15% de ácido esteárico e 50% de ácido oleico, correspondente a uma concentração de 263 mg/L, inferior ao índice de toxicidade. HWU (1997) concluiu então que, nas condições experimentais em que trabalhou, a flutuação ocorreu antes da inibição, ou seja para menores concentrações.

No presente trabalho, atingiram-se cargas mássicas de oleato de 1.2 e de 1.6 g CQO/gSV.dia no Período III para RI e RII respectivamente. A biomassa caracterizada no fim do período III apresentou uma taxa elevada de produção de metano devida a substrato residual, quando incubada em reactor fechado a 37 °C. Essa elevada produção foi detectada na realização dos ensaios em “branco” (sem adição de nenhum substrato) dos testes de actividade e/ou toxicidade e está representada na Figura 5.23.

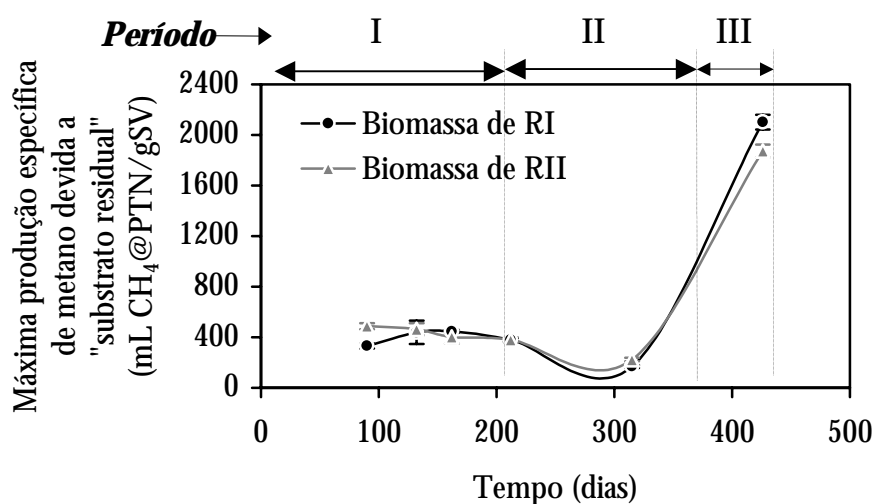


Figura 5.23 Evolução da quantidade de substrato residual que acompanhou a biomassa de RI e RII, ao longo do período de operação.

De salientar que, tal como descrito no procedimento experimental (**sub-Capítulo 4.3.5.1**, página 244), a biomassa após ter sido retirada dos digestores era centrifugada e ressuspensa em tampão anaeróbio para remoção do substrato residual, pelo que a anormal produção de metano deve ser devida a substrato adsorvido.

Considerando que todo o metano produzido foi proveniente de oleato adsorvido, obtêm-se valores de 782.1 ± 21.4 e 698.6 ± 19.0 mg de oleato adsorvido/gSV para a biomassa de RI e de RII respectivamente. Hwu (1997) obteve um máximo de 380 mg oleato/g sólidos totais (ST) nos ensaios de adsorção de oleato com uma concentração inicial de 2000 mg de oleato/L. As diferenças entre esses valores e os do presente trabalho são esperadas: enquanto que no presente trabalho se trabalhou em contínuo com uma concentração de 4150 mg oleato/L e se usou biomassa dispersa, Hwu (1997) trabalhou em reactor fechado com uma concentração de 2000 mg oleato/L e usou biomassa granular que, por ter uma menor área específica deve ter uma menor capacidade de adsorção. Além disso, exprimiu os valores por unidade de sólidos totais e não por unidade de sólidos voláteis.

Durante o Período II não foi detectada produção de metano devida ao “substrato residual”, tendo-se verificado mesmo uma redução dessa produção relativamente aos valores anteriormente obtidos. Isto sugere que a presença de co-substrato fez reduzir a adsorção do oleato na biomassa ou induziu a sua biodegradação. Neste período operatório a razão molar Oleato/($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$) já excedia o valor estequiométrico 2 (Tabela 5.4). A máxima taxa de degradação do “substrato residual” foi obtida para a maior concentração deste, tal como pode ser observado na Figura 5.24.

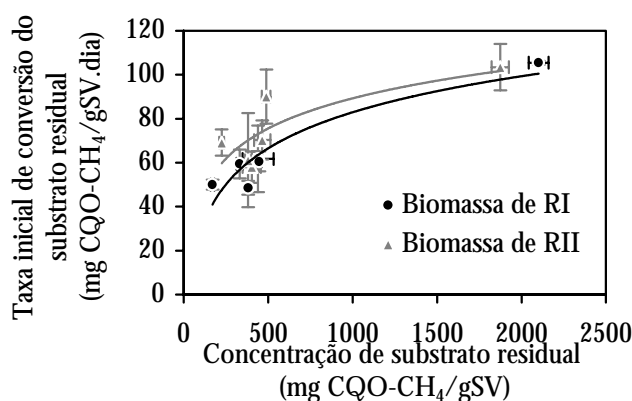


Figura 5.24. Variação entre a taxa de degradação e a concentração do substrato residual.

Os valores máximos das taxas de degradação de substrato residual obtidos foram de 105.4 ± 0.9 e 103.4 ± 10.6 mg CQO-CH₄/gSV.dia para a biomassa de RI e RII no final do período III e não foram observadas fases de latência, tal como pode ser observado na Figura 5.25, onde está representada a evolução da produção de metano ao longo do tempo, registada nos ensaios “em branco”.

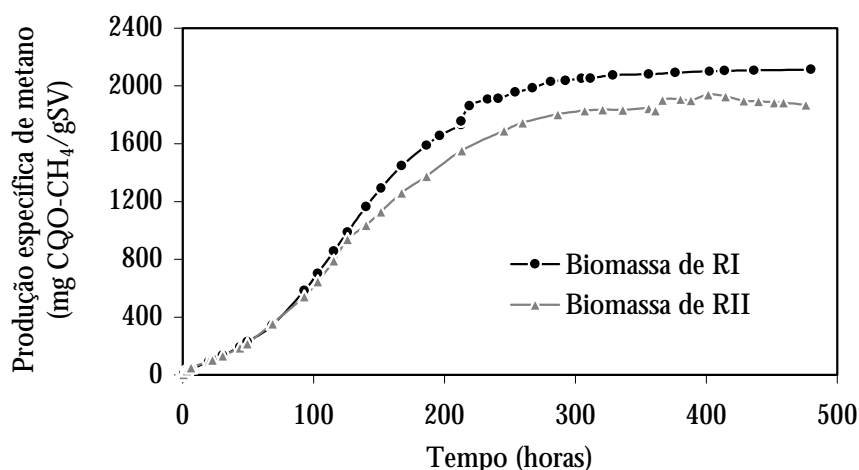


Figura 5.25 Produção específica de metano em reactor fechado sem adição de substrato pela biomassa de RI e RII, no final da operação.

5.4.5 Capacidade de biodegradação do oleato

Durante todo o período operatório foi medida a capacidade de degradação de oleato da biomassa de RI. Na Figura 5.26, está representada a taxa média de metanização (TM) (ver definição no **sub-Capítulo 5.3.4.4**, página 274), medida nos ensaios de biodegradabilidade ao longo do tempo de operação.

A taxa de metanização representa a relação entre o volume de metano produzido nos ensaios de biodegradabilidade e o volume teoricamente esperado se todo o oleato fosse transformado em metano. Refere-se uma taxa média porque em cada ensaio de biodegradabilidade se testaram 5 concentrações de ácido oleico. Pela análise da Figura 5.26, verifica-se que a conversão do oleato em metano foi aumentando ao longo do tempo de operação indicando que a biomassa de RI ganhou capacidade de degradação deste composto, relativamente aos valores obtidos no início da operação.

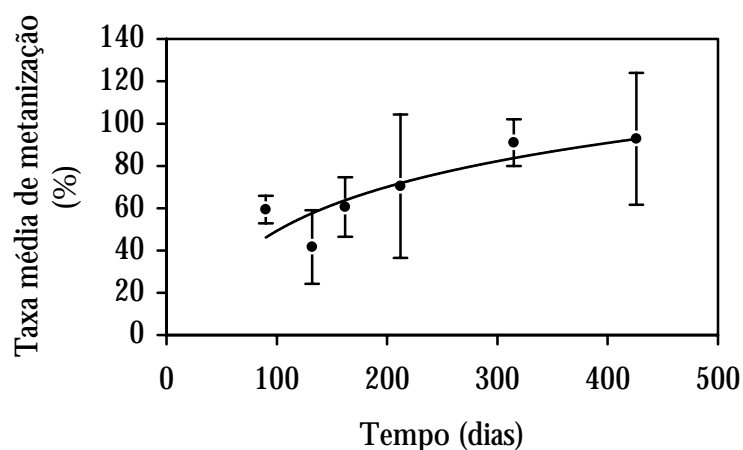


Figura 5.26 Evolução da taxa média de metanização do oleato de sódio ao longo do tempo de operação.

O valor obtido no último ponto (dia 426) deve ser analisado com reservas já que a biomassa estava encapsulada com oleato e, caso este tenha sido degradado, o volume de metano produzido poderia mesmo exceder o máximo teórico esperado pela degradação completa a metano, do oleato adicionado.

Como não se avaliou a capacidade de biodegradação de oleato da biomassa de RII, caracterizou-se, para efeitos de comparação, a capacidade de biodegradação de uma biomassa que, pelo menos durante os últimos três anos não tinha sido exposta a lípidos. Essa biomassa tinha uma actividade acetoclástica de 269 ± 10.7 mL CH_4 @PTN/gSV.dia e um índice de toxicidade (IC_{50}) de 140 mg oleato/L. A taxa média de metanização dessa biomassa foi 89%. Este valor é da ordem de grandeza dos valores máximos obtidos para a biomassa RI, sugerindo que, tal como aconteceu para a toxicidade, o contacto com os lípidos diminuiu a capacidade de metanização do oleato.

Relativamente à velocidade de degradação de oleato verificou-se que a biomassa caracterizada no dia 315 apresentou um máximo de 86.3 ± 4.3 mg CQO- CH_4 /gSV.dia para a concentração de 500 mg de oleato/L, superior aos valores obtidos com a biomassa anteriormente referida que não tinha sido exposta a lípidos até três anos antes da realização

do ensaio (Figura 5.27). Da comparação das duas curvas desta Figura, conclui-se que a biomassa de RI adquiriu capacidade de degradação do oleato.

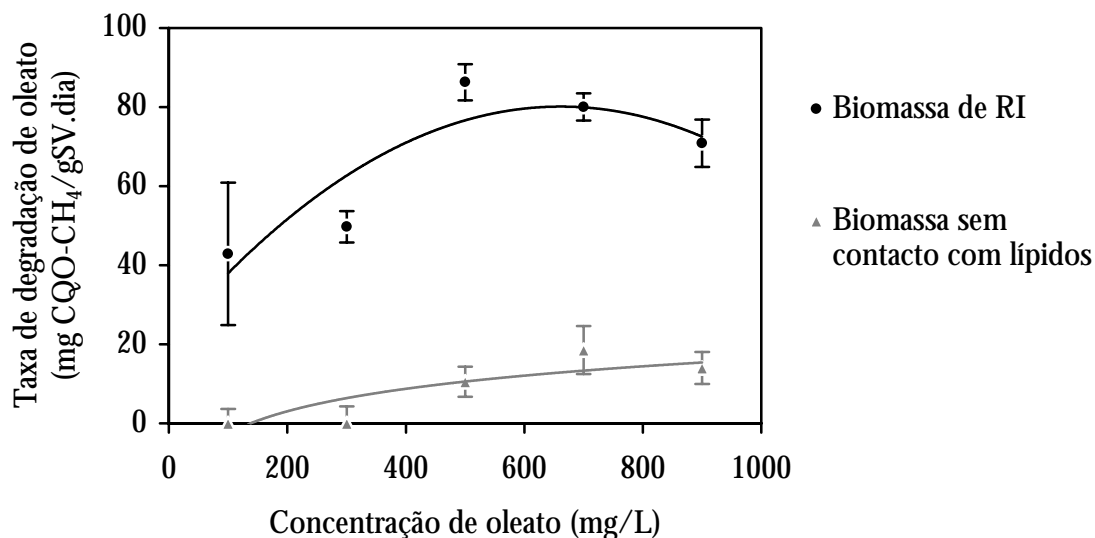


Figura 5.27 Taxa de degradação do oleato, medida em ensaios em reactor fechado. Comparação entre a biomassa de RI e uma biomassa que não tinha sido exposta a lípidos durante três anos.

Tal como referido anteriormente para os ensaios de toxicidade, os valores das taxas de degradação de oleato estão dependentes da existência ou não de fases de latência antes da produção inicial de metano. Nos ensaios com a biomassa retirada no dia 315 (Período II) não se registou fase de latência para nenhuma das concentrações testadas (Figura 5.28).

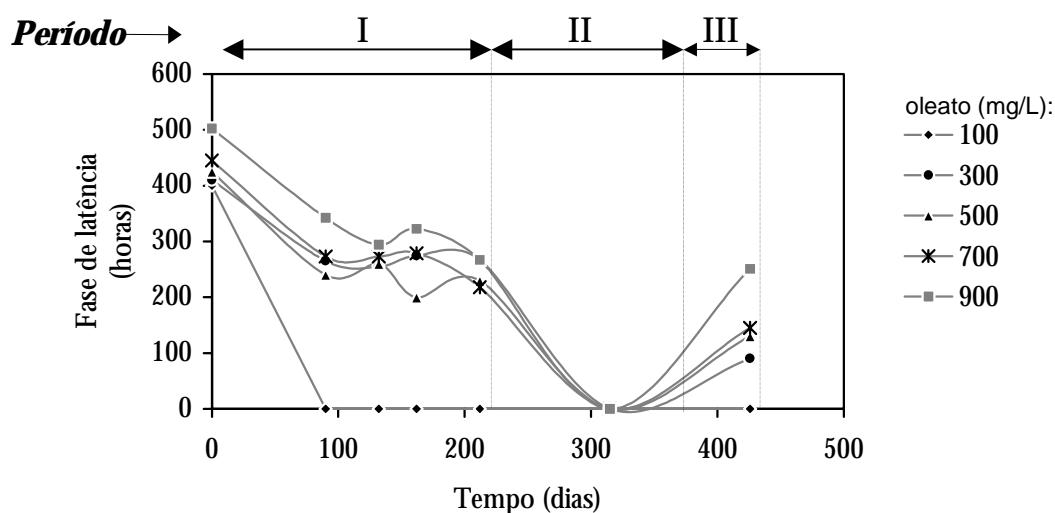


Figura 5.28 Fases de latência observadas nos ensaios de biodegradabilidade com a biomassa de RI.

Na Tabela 5.11 compara-se a taxa de degradação do oleato adsorvido com a taxa máxima de degradação do oleato obtida por adição a biomassa adaptada, mas não encapsulada com oleato (do dia 315) e com a taxa máxima de degradação obtida com biomassa não adaptada.

Tabela 5.11 Comparação das taxas de degradação de oleato por biomassa adaptada, não adaptada e encapsulada.

	Taxa de degradação de oleato mg CQO-CH ₄ /gSV.dia
Biomassa não adaptada	18.6±6.1 (*)
Biomassa adaptada	86.3±4.6 (*)
Biomassa encapsulada	105.4±0.9 (**)
(*) oleato adicionado	
(**) oleato adsorvido	

Verificou-se que o oleato adsorvido foi degradado mais rapidamente do que o oleato adicionado a uma biomassa não encapsulada, mas “adaptada” (biomassa de RI, dia 315 - período II). Foram obtidos respectivamente valores de 105.4±0.9 e de 86.3±4.3 mg CQO-CH₄/gVS.dia. Hwu (1997) obteve, em condições mesofílicas (entre 30 e 40 °C), valores entre 25 e 50 mg CQO-CH₄/gSV.dia, substancialmente inferiores aos obtidos no presente trabalho. Em condições termofílicas a taxa de degradação do oleato foi cerca de 4 vezes superior à obtida em condições mesofílicas.

Além disso, Hwu (1997) comparou a capacidade de degradação de oleato de biomassa granular e dispersa (obtida a partir da biomassa granular) e obteve, em condições termofílicas, valores de 84 e 98 mg CQO-CH₄/gSV.dia, respectivamente e concluiu que as limitações difusionais da biomassa granular conduziam a uma menor taxa de degradação do oleato. Assim, embora a biomassa granular pareça ser mais resistente à toxicidade pelo oleato, parece ter uma menor taxa de adsorção e de degradação deste composto.

Os resultados do ensaio de biodegradabilidade com a biomassa recolhida de RI no final da operação, indicaram a existência de uma fase de latência a anteceder o início da produção de metano, de duração variável com a concentração de oleato adicionada (Figura 5.29). Comparando a Figura 5.29 com a Figura 5.25 que representa a produção específica de metano no ensaio “em branco” concluiu-se que a adição de oleato retardou a degradação do oleato adsorvido na biomassa.

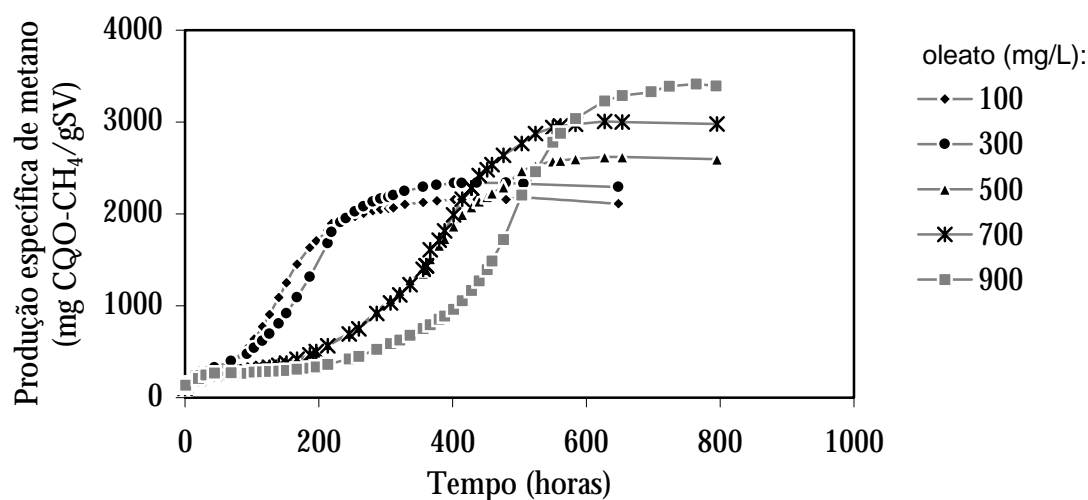


Figura 5.29 Ensaio de biodegradabilidade do ácido oleico com biomassa retirada do reactor RI no final da operação.

Em comparação com os resultados da literatura acima expostos, os resultados obtidos no presente trabalho sugerem a possibilidade de ser mais vantajoso utilizar biomassa dispersa do que granular no tratamento de efluentes contendo AGCL, devido à maior capacidade de adsorção e maior taxa de degradação de oleato adsorvido. Este último aspecto sugere também a possibilidade fazer ciclos sequenciais de adsorção-degradação com vantagem sobre um sistema contínuo. A pré-exposição a lipídios revelou-se benéfica no sentido da biomassa desenvolver resistência à toxicidade e capacidade de degradação do oleato de sódio.

5.5 Conclusões

Obteve-se uma remoção de mais de 90% de CQO solúvel de um efluente sintético contendo 12 g CQO/L de oleato como única fonte de carbono, mesmo com concentrações molares oleato/(Ca²⁺ +Mg²⁺) de 7.7. Comparando o comportamento da biomassa de dois digestores de leito fixo alimentados com efluentes sintéticos com diferentes teores de lípidos, foi possível concluir que a exposição a lípidos afectou a distribuição da biomassa entre a superfície do suporte e o espaço vazio da matriz. O biofilme formado na presença de lípidos foi menos denso em sólidos voláteis por m² do que o biofilme formado na ausência de lípidos. As actividades metanogénicas acetoclástica e hidrogenofílica foram muito semelhantes para ambos os digestores e a actividade em butirato foi estimulada no digestor alimentado com lípidos. A resistência à toxicidade do oleato de sódio foi superior na biomassa do digestor alimentado sem lípidos do que no digestor alimentado com lípidos.

Após alteração da composição do substrato alimentado a ambos os digestores, passando a ser constituído por oleato e um co-substrato e posteriormente só por oleato, foi possível averiguar o efeito da pré exposição a lípidos nas características da biomassa desenvolvida na presença de oleato, tendo-se concluído o seguinte:

- o biofilme formado na presença de lípidos foi mais resistente à presença de oleato do que o biofilme formado na ausência de lípidos. Houve uma remoção de mais de 50% deste biofilme após introdução do oleato na alimentação.
- as actividades metanogénicas acetoclástica e hidrogenofílica foram muito semelhantes para ambas as biomassas e a actividade em butirato da biomassa do reactor pré-exposto a lípidos diminuiu, tornando-se semelhante à da biomassa do reactor não exposto a lípidos, que sofreu um aumento.
- uma vez em contacto com oleato, a biomassa pré exposta a lípidos foi mais resistente ao efeito tóxico deste composto do que a biomassa não exposta a lípidos.

A biomassa caracterizada após a alimentação de oleato como única fonte de carbono mostrou estar encapsulada com este composto. A taxa de degradação do oleato adsorvido

na biomassa foi superior à máxima taxa de degradação de oleato medida com biomassa não encapsulada e, ambos os valores obtidos são superiores a valores da literatura obtidos com biomassa granular.

Concluiu-se que, do ponto de vista do tratamento de um efluente contendo ácido oleico, é benéfico aclimatizar a biomassa com lípidos no sentido de desenvolver resistência à toxicidade deste AGCL e capacidade de biodegradação.

A maior capacidade de adsorção da biomassa dispersa do que da granular e a elevada taxa de degradação do oleato adsorvido sugerem que possa ser vantajoso utilizar este tipo de biomassa e ciclos sequenciais de adsorção-degradação com vantagem sobre um sistema contínuo com biomassa granular.

6. Conclusões Gerais

Este trabalho centrou-se no estudo de digestores de leito fixo aplicados ao tratamento de efluentes lácteos sintéticos, dando-se especial importância à caracterização da biomassa e às relações entre a biomassa e o suporte neste tipo de digestores.

Um dos objectivos do trabalho foi a comparação de duas configurações de filtros anaeróbios, uma configuração segmentada em três andares e outra não segmentada. Inicialmente concluiu-se que a adição de macro e micro nutrientes era essencial para a eficiência e estabilidade operacionais. No digestor segmentado verificou-se que o 2º andar era o mais afectado pela ausência de nutrientes.

Numa 2ª fase de operação avaliou-se o efeito da concentração de substrato no comportamento dos digestores. Concluiu-se que a configuração do digestor não afectou o desempenho dos digestores em termos globais, mas que, com o aumento da concentração de substrato o digestor segmentado induzia uma maior estratificação dos intermediários ao longo da altura dos digestores, atingindo-se maiores valores de ácidos voláteis na base do digestor segmentado do que na base do digestor não segmentado. Este facto foi relacionado com o tipo de escoamento das duas configurações. O efeito de mistura foi mais acentuado no digestor não segmentado. No entanto, no digestor segmentado verificou-se um aumento do efeito de mistura com o aumento da concentração de substrato à entrada.

A actividade dos diferentes grupos tróficos do consórcio distribuiu-se ao longo da altura dos digestores de modo semelhante para ambas as configurações. A actividade acidogénica diminuiu da base para o topo, mais acentuadamente no digestor segmentado. Com o aumento da concentração de entrada esta actividade aumentou consideravelmente e foi detectada em todas as secções de ambos os digestores, a actividade sintrófica em propionato atingiu um máximo na secção do meio dos digestores e a actividade acetoclástica e hidrogenofílica passaram a ser máximas no topo. Além disso, a actividade acetoclástica tornou-se mais estratificada no digestor segmentado do que no digestor não segmentado, atingindo um valor mínimo na base que se supôs ter sido devido à diluição com bactérias acidogénicas.

Com o aumento da concentração de substrato, o tamanho dos agregados aumentou em ambos os digestores, em especial na secção de topo do digestor segmentado. No entanto, os agregados que possuíam maior velocidade de sedimentação acumularam-se na secção do

meio em ambas as configurações, onde se tinha registado a máxima actividade em propionato. Verificou-se haver uma relação crescente entre esta actividade e a velocidade de sedimentação, concluindo-se que a maior densidade dos agregados poderia favorecer a proximidade entre os grupos bacterianos envolvidos nas associações sintróficas. A dimensão fractal dos agregados também foi máxima nas secções do meio dos digestores, indicando que os agregados que sedimentavam mais rapidamente eram mais esféricos e tinham uma superfície mais lisa do que os agregados mais leves.

Numa 3ª fase de operação avaliou-se o efeito da diminuição do tempo de retenção e da introdução de alimentações laterais no digestor segmentado. As adições laterais permitiram distribuir a carga orgânica aplicada pelos vários andares. Verificou-se que o 2º andar era o que suportava uma maior carga orgânica, possibilitando a introdução de 46% da carga orgânica total aplicada no sistema. De facto, tinha-se concluído este andar tinha maior capacidade de remoção de substrato do que o 1º e o 3º andares.

Em termos globais não se detectaram diferenças entre o desempenho dos digestores nesta fase de operação, em que o tempo de retenção foi progressivamente decrescente e a concentração de substrato se manteve constante.

A actividade acetoclástica continuou a ser máxima no topo dos digestores, embora existisse em todas as secções. A actividade em H_2/CO_2 não mostrou uma tendência definida de estratificação ao longo da altura dos digestores e o máximo da actividade em propionato deslocou-se do meio para o topo em ambos os digestores, sendo mais elevada no digestor segmentado do que no não segmentado. Na configuração não segmentada, a actividade acidogénica em lactose decresceu da base para o topo e no digestor segmentado apresentou um máximo no 2º andar, onde se alimentava a maior parte da carga orgânica.

No topo de ambas as configurações verificou-se uma acumulação temporária de agregados microbianos de grandes dimensões. Em geral estes agregados tinham elevadas velocidades de sedimentação que mais uma vez mostrou ser relacionável com a actividade em propionato. No entanto, quando se introduziu uma alimentação na entrada do 3º andar, as partículas nesse andar diminuíram acentuadamente de tamanho. Essa diminuição de tamanho foi acompanhada por um aumento da velocidade de sedimentação e da rugosidade da superfície dos agregados. A desintegração dos agregados devido à acumulação interna de

biogás e o crescimento de bactérias acidogénicas na sua superfície foram hipóteses apontadas para explicar as variações observadas.

As experiências de distribuição de tempos de residência realizadas quando o tempo de retenção hidráulico era de 10 horas, permitiram concluir que nessas condições, e após 880 dias de operação, o volume “morto” nos digestores era da ordem dos 60%.

A comparação da operação do digestor segmentado com uma única alimentação com a operação do digestor não segmentado com alimentação distribuída permitiu concluir que, nestas condições operatórias, o digestor segmentado não alterou o seu desempenho, enquanto que no digestor não segmentado a eficiência foi reduzida 16%. No digestor segmentado verificou-se que o 2º andar era o menos eficiente.

No final da operação a biomassa estava distribuída uniformemente ao longo da altura dos digestores, o que se conclui ter sido devido às condições operatórias impostas, nomeadamente à distribuição das alimentações em ambos os digestores. A maior parte da biomassa (75 a 80%) estava retida na forma oclusa.

A caracterização da actividade dos vários grupos tróficos no final da operação permitiu concluir que, em geral, as actividades diminuíram em todas as secções de ambos os digestores (excepção da actividade em lactose no 1º andar do digestor segmentado), o que foi, em parte, atribuído ao diferente método de amostragem da biomassa.

Ao longo deste trabalho não foi possível retirar amostras de suporte sem que a operação e a distribuição das populações fossem afectadas. Além disso, em determinadas alturas surgiram problemas na amostragem dos sólidos oclusos. A dificuldade de caracterizar a biomassa e as suas interacções com o suporte em digestores de leito fixo, conduziu ao desenvolvimento de um método para estudar interacções entre a biomassa e o suporte neste tipo de digestores.

O método desenvolvido, constituído por um biorreactor em que o leito fixo era distribuído por mini-biorreactores independentes, permitiu realizar dois estudos independentes. Numa primeira experiência compararam-se três materiais de suporte com a mesma geometria (aneis de *Raschig*) com três tamanhos e, ao fim de 115 dias de operação, determinou-se a distribuição da biomassa nos vários materiais. Concluiu-se que a biomassa

oclusa, expressa como g de sólidos voláteis/L de vazio da matriz, se apresentou mais concentrada nos menores tamanhos de suporte e que a biomassa aderida, expressa como g de sólidos voláteis/m² de superfície de suporte, era maior nos maiores tamanhos de suporte. Verificou-se ainda que a velocidade intersticial podia condicionar a distribuição entre as duas formas de biomassa. Maiores velocidades intersticiais através do suporte induziam uma maior concentração de biomassa oclusa e uma menor concentração de biomassa aderida, expressas nas unidades acima indicadas.

Relativamente ao tipo de material, verificou-se que no vidro, que era a superfície mais lisa e mais hidrofílica, o biofilme era menos concentrado em sólidos e a visualização por microscopia electrónica de varrimento permitiu constatar a presença de bactérias semelhantes ao género *Methanospirillum*, que se sabe terem apetência para superfícies hidrofílicas.

Numa segunda experiência com a metodologia desenvolvida, apresentaram-se resultados que comprovam a utilidade desta metodologia para seguir evolutivamente a distribuição da biomassa no suporte. Durante 246 dias de operação, em que se aumentou progressivamente a concentração de um substrato lácteo sintético, verificou-se que a fracção de biomassa aderida aumentou linearmente ao longo do tempo de operação, atingindo um máximo de 40% da biomassa total retida. A actividade acetoclástica passou por um valor máximo durante a operação, mas a actividade em H₂/CO₂, propionato, butirato e etanol aumentaram a seguir à fase de arranque e mantiveram-se estáveis ou com tendência crescente ao longo da operação.

A metodologia desenvolvida foi posteriormente utilizada para estudar o efeito da presença de lípidos e de um ácido gordo de cadeia longa (oleato de sódio) no desenvolvimento da biomassa no tipo de digestores em estudo. Concluiu-se que o biofilme formado na presença de lípidos foi menos denso em sólidos voláteis por m² do que o biofilme formado na ausência de lípidos. As actividades metanogénicas acetoclástica e hidrogenofílica foram muito semelhantes para ambos os digestores e a actividade em butirato foi estimulada no digestor alimentado com lípidos.

Uma vez em contacto com um ácido gordo de cadeia longa (oleato de sódio), a biomassa pré exposta a lípidos foi mais resistente ao efeito tóxico deste composto do que a biomassa não exposta a lípidos. Além disso, o biofilme formado na presença de lípidos foi mais resistente à presença de oleato do que o biofilme formado na ausência de lípidos. Mais de 50% deste biofilme foi removido do suporte após a introdução do oleato na alimentação.

As actividades metanogénicas acetoclástica e hidrogenofílica foram muito semelhantes para ambas as biomassas e a actividade em butirato da biomassa do reactor pré-exposto a lípidos diminuiu, tornando-se semelhante à da biomassa do reactor não exposto a lípidos, que sofreu um aumento após a introdução de oleato.

Após a alimentação de oleato como única fonte de carbono, a biomassa mostrou estar encapsulada com este composto. A taxa de degradação do oleato adsorvido na biomassa foi superior à máxima taxa de degradação de oleato obtida com biomassa adaptada, mas não encapsulada e, ambos os valores obtidos são superiores a valores da literatura obtidos com biomassa granular.

Concluiu-se que, do ponto de vista do tratamento de um efluente contendo ácido oleico, é benéfico aclimatizar a biomassa com lípidos no sentido de desenvolver resistência à toxicidade deste AGCL e de aumentar a capacidade da sua biodegradação.

7. Síntese e Perspectivas de Trabalho

Após realização do presente trabalho, muitas questões ficaram sem resposta. Relativamente à operação do digestor segmentado, pensa-se que os ensaios realizados ficaram aquém do que seria desejável, quer em termos das condições operatórias impostas, quer em termos da estratégia de operação. Seria interessante testar os limites de aplicabilidade do digestor segmentado, em comparação com a configuração tradicional, sem alimentação repartida. De facto, no presente trabalho não se conclui sobre qual a configuração mais eficiente nessas condições porque as condições de carga impostas não foram limitantes e portanto ambos os digestores operaram com eficiências praticamente completas.

Os ensaios com alimentação repartida permitiram obter algumas conclusões, embora os dados obtidos levem a crer que a operação, nestas condições deveria ter sido mais aprofundada. A tentativa de fazer um estudo integrado em que se caracterizaram muitas variáveis acabou por condicionar a obtenção de resultados praticos relativos à operação dos digestores. No presente caso, o desempenho dos digestores foi mais ditado pelas condições de substrato e de tempo de retenção hidráulico do que pela configuração do digestor.

A operação deste tipo de sistema com um efluente real de uma indústria de lacticínios será interessante, sendo previsíveis problemas de inibição pelos AGCL.

Relativamente aos resultados obtidos na toxicidade do ácido oleico seria interessante prolongar este estudo com realização de ensaios de adsorção-degradação com biomassa dispersa, comparando com os valores da literatura. Dependendo dos resultados, a operação de um digestor com ciclos de adsorção-degradação poderia então ser equacionada e testada a nível laboratorial.

A metodologia que se apresentou no **Capítulo 4** permite obter informação acerca do comportamento da biomassa em digestores anaeróbios de leito fixo. A aplicação a outros substratos em termos comparativos tal como foi realizada para avaliar o efeito dos lípidos, pode fornecer informações importantes sobre a distribuição e a evolução da biomassa.

No entanto esta metodologia não permitiu nem permite obter dados relativos à estratificação da biomassa a exemplo do que se obteve com o digestor segmentado e com o digestor não segmentado referidos no **Capítulo 3**.

A metodologia utilizada nos testes de actividade, toxicidade e biodegradabilidade revelou-se muito útil pela sua reprodutibilidade, sensibilidade e por ser um método relativamente expedito de obter informação sobre diferentes grupos tróficos do consórcio microbiano anaeróbio desenvolvido em sistemas de tratamento anaeróbio de efluentes. A aplicação desta metodologia com uma variedade de substratos, conjugada com a utilização de inibidores específicos de alguns grupos tróficos, é potencialmente interessante para estudar mais profundamente o complexo mundo microbiano dos digestores anaeróbios.

8. Referências Bibliográficas

- AHRING, B.K. (1995) Methanogenesis in thermophilic biogas reactors. *Antonie van Leeuwenhoek*, 67, 91-102.
- AHRING, B.K., CHRISTIANSEN, N., MATHRANI, I., HENDRIKSEN, H.V., MACARIO, A.J.L. E CONWAY DE MACARIO, E. (1992) Introduction of a de novo remediation ability, aryl reductive dechlorination, into anaerobic granular sludge by inoculation of sludge with *Desulfomonile tiedjei*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 3677-3682.
- ALPHENAAR (1994) Anaerobic granular sludge: characterization and factors affecting its performance. *Ph.D. Thesis*. Wageningen Agricultural University. The Netherlands.
- ALVES, M.M. (1992) Estudo de optimização do funcionamento de um filtro anaeróbio. *Tese de Mestrado*, IST, Lisboa.
- ALVES, M.M., ÁLVARES PEREIRA, M.R., MOTA VIEIRA, J.A. E MOTA, M. (1997 a) Effect of lipids on biomass development in anaerobic fixed film reactors treating a synthetic dairy waste. *In: Proc Int. Symp. Environ. Biotechnol. (ISEB)*, Verachtert, H. e Verstraete, W. (Eds.) Ostende, Bélgica, part II, 521-524.
- ALVES, M.M., BELLOUTI, M. PEREIRA, M.A., ÁLVARES PEREIRA, M.R., MOTA VIEIRA, J.A. NOVAIS, J.M. E MOTA, M. (1998) A new method to study interactions between biomass and packing material in anaerobic fixed bed reactors. *Biotechnol. Tech.*, 12, 4, 277-283.
- ALVES, M.M., PEREIRA, M.A., MOTA, M., NOVAIS, J.M. E COLLERAN, E. (1997 b) Staged and non-staged anaerobic filters: microbial activity segregation, hydrodynamic behaviour and performance. *J. Chem Technol. Biotechnol. (no prelo)*.
- ALVES, M.M., PEREIRA, M.A., POLANCO, F., NOVAIS, J.M. E MOTA, M. (1997 c) A new device to select microcarriers for biomass immobilization: application to an anaerobic consortium. *Wat Environ. Res.* (aceite).
- AMARAL, A.L., ALVES, M.M., MOTA, M. E FERREIRA, E.C. (1997) Morphological characterization of microbial aggregates by image analysis. *In: Proc. RECPAD'97 - 9th Portuguese Conference on Pattern Recognition*, (APRP, Eds.), Coimbra, 95-100.
- ANDERSON, G.K. KASAPGIL, B. E INCE, O. (1994) Comparison of porous and non-porous media in upflow anaerobic filters when treating dairy wastewater. *Wat. Res.*, 28, 1619-1624.
- ANDERSON, G.K. KASAPGIL, B. E INCE, O. (1994) Microbiological study of two-stage anaerobic digestion during start-up. *Wat. Res.*, 28, 11, 2383-2392.
- ANDERSON, G.K., CAMPOS, C.M.M., CHERNICHARO, C.A.L. E SMITH, L.C. (1991) Evaluation of the inhibitory effects of lithium when used as a tracer for anaerobic digesters. *Wat. Res.*, 25:7, 755-760.
- ANDREWS, J.F. E GRAEF, S.P. (1971) Dynamic modeling and simulation of the anaerobic digestion process. *Adv. Chem. Ser.*, 105, 126-162.
- ANGELIDAKI, I. E AHRING, B.K. (1992) Effects of free long-chain fatty acids on thermophilic anaerobic digestion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 37, 808-812.

- ANGELIDAKI, I. E AHRING, B.K. (1995) Establishment and characterization of an anaerobic thermophilic enrichment culture degrading long-chain fatty acids. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61,6, 2442-2445.
- AN-RONG, Z., LI-BIN, W., SHI-DING, W E LI, P. (1997) Development and prospect of the research and application of anaerobic digestion. *In: Proc. 8th Int. Conf. Anaerobic Digestion* 25-29 May, Sendai, Japão, Vol. 2, 263-271.
- APHA, AWWA, WPCF (1989) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 17th ed., Washington.
- APOLINARSKI, M.E. (1991) Anaerobic treatment of yeast plant effluent in fermentation reactor system compared with an upflow filter system. *Wat. Sci. Technol.*, 24:7, 195-202.
- ARROJA, L. (1993) Avaliação do comportamento do filtro anaeróbio horizontal. *Tese de Doutorado*, Universidade de Aveiro.
- ASPÉ, E., MARTI, M.C. E ROECKEL, M. (1997) Anaerobic treatment of fishery wastewater using a marine sediment inoculum. *Wat. Res.*, 31, 2147-2160.
- ATTAL, A., EHLINGER, F., AUDIC, J.M. E FAUP, G.M. (1986) Anaerobic fermentation at low pH: glucose and intermediate product degradation kinetics. In *Conference Papers of "Anaerobic Treatment a Grown-Up Technology"*, AQUATEC'86, Industrial Presentations B.V., Schiedam, 63-76.
- AUSTERMAN-HAUN, U., SEYFRIED, C.F., ZELLNER, G. E DIEKMANN, H. (1994) Start-up of anaerobic fixed film reactors: Technical aspects. *Wat. Sci. Technol.*, 10-11, 297-308.
- BALCH, W.E. E WOLFE, R.S. (1979) Specificity and biological distribution of coenzyme M (2-mercaptoethane sulfonic acid). *J. Bacteriol.*, 137, 256-263.
- BALCH, W.E., FOX, G.E., MAGRUM, L.J., WOESE E C.R., WOLFE, R.S. (1979). Methanogens: reevaluation of a unic biological group, *Microbiol. Rev.*, 43, 260-269.
- BARKER, H.A. (1936) *Arch. Mikrobiol.*, 7, 420. (referido em ZEHNDER *et al.*, 1982)
- BARKER, H.A. (1937) The production of caproic and butyric acid by the methane fermentation of ethyl alcohol. *Arch. Microbiol.*, 8, 416-421.
- BARKER, H.A. (1956) Bacterial fermentation. J. Wiley, New York. (referido em ZEHNDER *et al.*, 1982)
- BARREDO, M.S. E EVISON, L.M. (1991) Effect of propionate on methanogen enriched sludge, *Methanobrevibacter smithii*, and *Methanospirillum hungatii* at different pH values. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 1764-1769.
- BECCARI, M. E MAJONE, M. (1997) Replay to comments by C. Hwu, J.B.van Lier e G. Lettinga on "Interactions between acidogenesis and methanogenesis in the anaerobic treatment of olive oil mill effluents". *Wat. Res.*, 31:12, 3168.
- BECCARI, M., BONEMAZZI, F., MAJONE, M. E RICCARDI, C. (1996) Interactions between acidogenesis and methanogenesis in the anaerobic treatment of olive oil mill effluents. *Wat. Res.*, 30, 183-189.

- BECHAMP, A. (1868) *Ann. Chim. Phys.*, 13, 103. (referido em ZEHNDER *et al.*, 1982).
- BELAY, N., SPARLING, R. E DANIELS, L. (1984) Dinitrogen fixation by a thermophilic methanogenic bacterium. *Nature*, 312, 286-288.
- BELLOUTI, M. (1994) Commande adaptative et estimation d'état de la methanogenese en bioreacteur. *Thèse de Doctorat*, Université Catholique de Louvain, Louvain La Neuve.
- BELLOUTI, M., ALVES, M.M., NOVAIS, J.M. E MOTA, M. (1997) Floccs vs granules: differentiation by fractal dimension, *Wat. Res.*, 31, 5, 1227-1231.
- BHATNAGER, L., JAIN, M.K., AUBERT, J.P. E ZEIKUS, J.G. (1984) Comparison of assimilatory nitrogen, sulfur and carbon sources for growth of *Methanobacterium* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 48, 785-.
- BOLLE, W.L., VAN BREUGEL, J., VAN EYBERGEN, G.C., KOSSEN, N.W.F. E ZOETEMEYER, R.J. (1986) Modeling the liquid flow in up-flow anaerobic sludge blanket reactors. *Biotechnol. Bioeng.*, 28, 1615-1620.
- BOMAR, M., KNOLL, K. E WIDDEL, F. (1985) Fixation of molecular nitrogen by *Methanosarcina barkeri*. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 31, 47-55.
- BONASTRE, N. E PARIS, J.M. (1988) Colonisation and stimulation/inhibition properties of different supports used in anaerobic fixed-film reactors. *Environ. Technol. Lett.*, 9, 763-768.
- BONASTRE, N. E PARIS, J.M. (1989) Survey of laboratory, pilot and industrial anaerobic filter installations. *Process Biochem.*, 2, 15-20.
- BONASTRE, N. PARIS, J.M. LOPEZ-SANTIN, J. E RUHUES, E. (1986) Start-up and performance of an upflow anaerobic filter treating diluted pig slurry. In: *Conference Papers of "Anaerobic Treatment a Grown-Up Technology"*, AQUATEC'86, Industrial Presentations B.V., Schiedam, 596-599.
- BOONE, D.R. E BRYANT, M.P. (1980) Propionate degrading bacterium, *syntrophobacter wolinii* sp. nov. gen. nov., from methanogenic ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.*, 40, 626-632.
- BORTONE, G. E PICCININI, S. (1988) A full scale upflow anaerobic filter treating pea, maize and green pea processing wastes. In: *Poster-Papers 5th Int. Symp. Anaerobic Digestion*, A. Tilche e A. Rozzi (Eds.), Pergamon Press, New York, 459-462.
- BRITZ, T.J., NOETH, C. E LATEGAN, P.M. (1988). Nitrogen and phosphate requirements for the anaerobic digestion of a petrochemical effluent. *Wat. Res.*, 22:2, 163-169.
- BRITZ, T.J., SPANGENBERG, G. E VENTER, C.A. (1994) Acidogenic microbial species diversity in anaerobic treating different substrates. *Wat. Sci. Technol.*, 30:12, 55-62.
- BRODERICK, T.A. E SHERRARD, J.H. (1985). Treatment of nutrient deficient wastewaters. *J. Water Pollut. Control Fed.*, 57:12, 1178-1181.
- BRUL, S. E STUMM, C.K. (1994) Symbionts and organelles in anaerobic protozoa and fungi. *Tree*, 9, 319-323.

- BRYANT, M.P. (1976) The microbiology of anaerobic degradation and methanogenesis with special reference to sewage. In *Seminar on Microbial Energy Conservation*. H.G. Schlegel (Ed.) E. Goltze KG, Göttingen, Germany, 107-117.
- BRYANT, M.P., WOLIN, E.A., WOLIN, M.J. E WOLFE, R.S. (1967) *Methanobacillus omelianskii*, a symbiotic association of two species of bacteria. *Arch. Microbiol.*, 59, 20-31.
- BUSWELL, A.M. E NEAVE, S.L. (1930) Laboratory studies of sludge digestion. *State Water Survey, Bulletin* nº 30, State of Illinois, Urbana, Illinois, USA.
- BUVET, R. (1986) Energy conservation through anaerobic digestion in municipal sewage treatment plants in the European Communities. In: *Anaerobic Digestion: results of research and demonstration projects*, M.P. Ferrari, G.L. Ferrero e P. L'Hermite (Eds), Elsevier Applied Science, 210-217.
- CAIRÓ, J.-J. E PARÍS, J.M., (1988). Microbiología de la digestión anaerobia, metanogenesis. In *Actas del 4º Seminario D.A.A.R.*, F.Fdz. - Polanco, P.A. Garcia, S. Hernando (Eds.), Univ. Valladolid, 41-51.
- CALLENDER, I.J. E BARFORD, J.P. (1983) Recent advances in anaerobic digestion technology. *Proc. Biochem.*, 18, 24-30.
- CARRONDO M.J.T. SILVA, J.M.C. GANHO, R.M.B. FIGUEIRA E M.I. OLIVEIRA, J.F.S. (1982) Anaerobic filter treatment of molasses fermentation wastewater. In: *Proc. IAWPR Specialized Seminar on Anaerobic Treatment*, 243-252, Copenhagen, Denmark.
- CHEESEMAN, P., TOMS-WOOD, A. E WOLFE, R.S. (1972) Isolation and properties of a fluorescent compound, factor 420, from *Methanobacterium* Strain M.o.H. *J. Bacteriol.*, 112:1, 527-531.
- CHEN, S.J., LI, C.T. E SHIEH, W.K. (1988) Anaerobic fluidized bed treatment of an industrial wastewater. *J. Water Pollut. Control Fed.*, 60:10, 1826-1832.
- CHEUNG, M.Y., OAKLEY, D.L. E FORSTER, C.F. (1986) An examination of anaerobic upflow filters operated in a cascade sequence. *Environ. Technol. Lett.*, 7, 383-390.
- CHIANG, C.F. E DAGUE, R. (1992) Effects of reactor configuration and biomass activity on the performance of upflow static media anaerobic reactors. *Wat. Environ. Res.*, 64:2, 141-178.
- CHUNG, Y.C. E NEETHLING, J.B. (1988) ATP as a measure of sludge digester activity. *J. Wat. Pollut. Cont. Fed.*, 60, 108-112.
- COATES, J. (1991) Development, characterisation and stabilisation of granular methanogenic sludges. *Ph.D. Thesis*, National University of Ireland.
- COATES, J.D., COUGHLAN, M.F. E COLLERAN, E. (1996) Simple method for the measurement of the hydrogenotrophic methanogenic activity of anaerobic sludges. *J. Microbiol. Meth.*, 26, 237-246.
- COLLERAN, E. E PISTILLI, A. (1994) Activity test system for determining the toxicity of xenobiotics chemicals to the methanogenic process. *Ann. Microbiol. Enzimol.*, 44, 1.
- COLLERAN, E., CONCANNON, F., GOLDEM, T., GEOGHEGAN, F., CRUMLISH, B., KILLILEA, E., HENRY, M. E COATES, J. (1992) Use of methanogenic activity tests to characterize anaerobic sludges, screen

- for anaerobic biodegradability and determine toxicity thresholds against individual anaerobic trophic groups and species. *Wat. Sci. Technol.*, 25, 31-40.
- COLLERAN, E., FINNEGAN, S. E LENS, P.N.L. (1995) Anaerobic treatment of sulphate-containing waste streams. *Antonie van Leeuwenhoek*, 67, 29-46.
- COLLERAN, E., WILKIE, A., BARRY, M., FAHERTY, G., O'KELLY, N. E REYNOLDS, P.J. (1983) One and two stage anaerobic filter digestion of agricultural wastes. *In: Proc. Third Int. Symp. Anaerobic Digestion*, Boston, Massachussets, 285-302.
- COLLIVIGNARELLI, C. URBINI, G. FARNETI, A. BASSETTI, A. E BARBARESI, U. (1991) Economical removal of organic and nutrient substances from municipal wastewaters with full-scale UASB fluidized and fixed-bed reactors. *Wat. Sci. Technol.*, 24:7, 89-95.
- COLLIVIGNARELLI, C. URBINI, G. FARNETI, A. BASSETTI, A. E BARBARESI, U. (1990) Anaerobic-aerobic treatment of municipal wastewaters with full-scale upflow anaerobic sludge blanket and attached biofilm reactors. *Wat. Sci. Technol.*, 22:1/2, 475-482.
- CONCANNON, F., QUINN, M., O'FLAHERTY, S E COLLERAN, E. (1988) Automated measurement of the specific methanogenic activity of anaerobic digestion biomass. *Biochem. Soc. Transact*, 17, 425.
- DAFFONCHIO, D., THAVEESRI, J. E VERSTRAETE, W. (1995) Contact angle measurement and cell hydrofobicity of granular sludge from upflow anaerobic sludge bed reactors. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 3676-3680.
- DAHAB, M. E YOUNG, J.C. (1982). Retention and distribution of biological solids in fixed-bed anaerobic filters. *In: Proc. 1st Int. Conf. on Fixed-Film Biological Processes*, Kings Island, Ohio, 1337-1351.
- DAHAB, M.F. E YOUNG, J.C. (1981) Energy recovery from alcohol stillage using anaerobic filters. *Biotechnol. Bioeng Symp.* Nº 11, 381-397.
- DALLA TORRE, A. E STEPHANOPOULOS, G. (1986) Simulation study of anaerobic digestion control. *Biotechnol. Bioeng*, 28, 1138-1153.
- DANCKWERTS, P.V. (1953) Continuous flow systems - distribution of residence times. *Chem. Eng Sci.*, 2, 1, 1-18.
- DANGCONG, P., XINGWEN, Z, QITING, J., LIANGKUI, X. E DE, Z. (1994) Effects of the seed sludge on the performance of UASB reactors for treatment of toxic wastewater. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 60, 171-176.
- DANIELS, L. (1991) Biotechnological potential of methanogenic bacteria. *In: The Archaeobacteria: Biochemistry and Biotechnology*, Danson, M.J., Hough, D.W. e Lunt, G.G (Ed.) Biochemical Society Symposium nº 58, Edinburgh, 181-193.
- DANIELS, L., SPARLING, R. E SPROTT, G.D. (1984) The bioenergetics of methanogenesis. *Biochim Biohys. Acta*, 768, 113-163.
- DANIELS, S. L. (1980) Mechanisms involved in sorption of microorganisms to solid surfaces. *In: Adsorption of Microorganisms to Surfaces*, Bitton, G. e Marshall, K. (Eds.) John Wiley & Sons, New York, 8-58.

- DE MAN, A.W.A., VAN DER LAST, A.R.M. E LETTINGA, G. (1988) The Use of EGSB and UASB anaerobic systems for low strength soluble and complex wastewaters at temperatures ranging from 8 to 30 °C. In: *Poster-Papers 5th Int. Symp. Anaerobic digestion*, E.R. Hall, P.N. Hobson (Eds), Pergamon Press, New York, 197-209.
- DELAFONTAINE, M.J., NAVEAU, H.P. E NYNS, E.J. (1979) Fluorimetric monitoring of methanogenesis in anaerobic digesters. *Biotechnol. Lett.*, 1, 71-73.
- DEMEYER, D.I. E HENDERICKX, H.K. (1967) The effects of C18 unsaturated fatty acids on methane production in vitro by mixed rumen bacteria. *Biochim. Biophys Acta*, 137, 484-497.
- DeWalle, F.B. e Chian, E.S.K. (1976) Kinetics of substrate removal in completely mixed anaerobic filter. *Biotechnol. Bioeng.*, 18, 1275-1295.
- DINSDALE, R.M., HAWKES, F.R. E HAWKES, D.L (1997) Mesophilic and Thermophilic anaerobic digestion with thermophilic pre-acidification of instant-coffee-production wastewater. *Wat. Res.*, 31, 1931-1938.
- DI STEFANO, T.D., GOSSET, J.M. E ZINDER, S.H. (1992) Hydrogen as an electron donor for dechlorination of tetrachloroethene by an anaerobic mixed culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 3622-3629.
- DODDEMA, H.J E VOGELS, G.D. (1978) Improved identification of methanogenic bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 36, 5, 752-754.
- DOLFING J. (1987) Microbiological aspects of granular methanogenic sludge. *Ph.D. Thesis*, Agricultural University Wageningen, The Netherlands.
- DOLFING, J. (1988) Acetogenesis. In *Biology of Anaerobic Microorganisms*, Alexander J. B. Zenhder (Ed.), John Wiley & Sons, New York, 417-468.
- DOLFING, J. (1992) The energetic consequences of hydrogen gradients in methanogenic ecosystems. *FEMS Microbiol. Ecology*, 101, 183-187.
- DOLFING, J. E BLOEMEN, W.G.B.M. (1985) Activity measurements as a tool to characterize the microbial composition of methanogenic environments. *J. Microbiol. Methods*, 4, 1-12.
- DOLFING, J. E MULDER, J.-W. (1985) Comparison of methane production rate and coenzyme F₄₂₀ content of methanogenic consortia in anaerobic granular sludge. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, 1142-1145.
- DONLON, B. (1992) Acetogenesis, bacterial adhesion and lignocellulose conversion. *Ph.D. Thesis* University College, Galway, Ireland.
- DONOVAN, E.J. (1981) Treatment of high strength wastes by an anaerobic filter. In: *Anaerobic Filters: an Energy Plus for Wastewater Treatment*, Argonne National Laboratory, Illinois, 179-198.
- DORNSEIFFER, P., MEYER, B. E HEINZLE, E. (1995) Modeling of anaerobic formate kinetics in mixed biofilm culture using dynamic menbrane mass spectrometric measurement. *Biotechnol. Bioeng.*, 45, 219-228.

- EASTMAN, J.A. E FERGUSON, J.F. (1981). Solubilization of particulate organic carbon during the acid phase of anaerobic digestion. *J. Wat. Pollut. Control Fed.*, 53:3, 352-366.
- ECKENFELDER, W.W., PATOCZKA, J.B. E PULLIAM, G.W. (1988) Anaerobic versus aerobic waste treatment in the U.S.A. *In: Poster-Papers 5th Int. Symp. Anaerobic Digestion*, A.Tilche e A. Rozzi (Eds), Pergamon Press, New York, 105-114.
- EL-SHAFIE, A.T. E BLOODGOOD, D.E. (1973) Anaerobic treatment in a multiple upflow filter system. *J. Wat. Pollut. Control Fed.*, 45, 11, 2345-2357.
- ESTEBAN, G., TÉLLEZ, C. E BAUTISTA, L.M. (1991) Dynamics of ciliated protozoa communities in activated- sludge process. *Wat. Res.*, 25:8, 967-972.
- FAIR, G.M. E MOORE, E.W. (1934) Time and rate of sludge digestion and their variation with temperature. *Sew. Works J.*, 6, 3-10.
- FANG H.H.P. (1997) Microbial distribution and syntrophic association in UASB reactors. *In: Proc. 8th Int. Conf Anaerobic Digestion*, Sendai, Japão, Vol. 1, 83-90.
- FANG, H.H.P., CHUI, H.K. E LI, Y.Y. (1994) Microbial structure and activity of UASB-granules treating different wastewaters. *Wat. Sci. Technol.*, 30, 12, 87-96.
- FENCHEL, T. E FINLAY, B.J. (1991) Endosymbiotic methanogenic bacteria in anaerobic ciliates: significance for the growth efficiency of the host. *J. Protozool.*, 38, 18-22.
- FERNÁNDEZ-POLANCO, F. E DIEZ, V. (1988) Reactores anaerobios de lecho fluidizado diseño y operacion. *In: Actas del 4º Seminario D.A.A.R.*, F.Fdz. Polanco, P.A. Garcia, S. Hernando (Eds.), Univ. Valladolid, 170-189.
- FERREIRA, E.C. (1995) Identificação e controlo adaptativo de processos biotecnológicos. *Tese de doutoramento*, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Porto.
- FERRY, J.G. (1992) Biochemistry of methanogenesis. *Critical Rev. Biochem. Molec. Biol.*, 27:6, 473-503.
- FIELD, J.A., STAMS, A.J.M., KATO, M. E SCHRAA, G. (1995) Enhanced biodegradation of aromatic pollutants in cocultures of anaerobic and aerobic bacterial consortia. *Antonie van Leeuwenhoek* 67, 47-77.
- FINNEGAN, S.M.T. (1994) Anaerobic digestion of sulphate-containing wastewater from citric acid production. *Ph.D. Thesis*, National University of Ireland.
- FLORÊNCIO, L. FIELD, J.A. E LETTINGA, G. (1997) Methanol degradation in anaerobic bioreactors. *In Proc. 8th International Conf. on Anaerobic Digestion*, Sendai, Japão, Vol. 3, 35-38.
- FOGLER, H. S. (1986) Elements of Chemical Reaction Engineering. Prentice-Hall International Editions.
- FONTAINE, F.E., PETERSON, W.H., MCCOY, E., JOHNSON, M.J. E RITTER, G.J. (1942) A new type of glucose fermentation by *Clostridium thermoaceticum* n. sp. *J Bacteriol.*, 43, 701-715.

- FORAGE, R.G., HARRISON, D.E.F. E PITT, D.E. (1985) Effect of environment on microbial activity. *In: Comprehensive Biotechnology: The Principles, Applications and Regulations of Biotechnology in Industry, Agriculture and Medicine*. M. Moo-Young. (Ed) Pergamon Press, Oxford, UK, Vol 1, p 251-280.
- FORSTER, C. (1994) Anaerobic digestion and industrial wastewater treatment. *Chemist. Indust.*, 6, 404-409.
- FORSTER, C.F. (1992) Oils, fats and greases in wastewater treatment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 55, 402-404.
- FOX, P., SUIDAN, M.T. E BANDY, J.T. (1990) A comparison of media types in acetate fed expanded-bed anaerobic reactors. *Wat. Res.*, 24:7, 827-835.
- FUKUZAKI, S., NISHIO, N., SHOBAYASHI, M. E NAGAI, S. (1990) Inhibition of the fermentation of propionate to methane by hydrogen, acetate and propionate. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 719-723.
- GALBRAITH, H. E MILLER, T.B. (1973) Physicochemical effects of long chain fatty acids on bacterial cells and their protoplasts. *J. Appl. Bact.*, 36, 647-658.
- GALBRAITH, H., MILLER, T.B., PATON, A.M. E THOMSON, J.K. (1971) Antibacterial activity of long chain fatty acids and the reversal with calcium, magnesium, ergocalciferol and cholesterol. *J. Appl. Bacteriol.*, 34, 803-813.
- GEOGHEGAN, F. (1989) Methanogenic activity test. *M.Sc. Thesis*. National University of Ireland.
- GOLDBERG, I. E COONEY, C.L. (1981) Formation of short chain fatty acids from H₂ and CO₂ by a mixed culture of bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41, 148-154.
- GRADY, C.P.L.JR. E LIM, H.C. (1980) *Biological Waste Treatment*, Marcel Dekker, Inc., New York.
- GROBICKI, A. E STUCKEY, D.C. (1991) Performance of the anaerobic baffled reactor under steady-state and shock loading conditions. *Biotechnol. Bioeng.*, 37, 344-355.
- GROBICKI, A. E STUCKEY, D.C. (1992) Hydrodynamic characteristics of the anaerobic baffled reactor, *Wat. Res.*, 26, 3, 371-378.
- GUIOT, S.R. E VAN DEN BERG, L. (1985) Performance of an upflow reactor combining a sludge blanket and a filter treating sugar waste. *Biotechnol. Bioeng.*, 27, 800-806.
- GUIOT, S.R., GORUR, S.A. E KENNEDY, K.J. (1988) Nutricional and environmental factors contributing to microbial aggregation during upflow anaerobic sludge bed filter (UBF) reactor start-up. *In: Proc. 5th Int. Symp. Anaerobic Digestion*, E.R. Hall and P.N. Hobson (Eds), Pergamon Press, New York, 47-53.
- GUIOT, S.R., SAFI, B., FRIGON, J.C., MERCIER, P., MULLIGAN, C., TREMBLAY, R. E SAMSON, R. (1995) Performances of a full-scale novel multiplate anaerobic reactor treating cheese whey effluent. *Biotechnol. Bioeng.*, 45, 398-405,
- GUJER, W. E ZEHNDER, A.J.B. (1983) Conversion processes in anaerobic digestion, *Wat. Sci. Technol.*, 15, 127-167.

- HABETS, L.H.A., ENGELAAR, A.J.H.H. E GROENEVELD, N. (1997) Anaerobic treatment of inuline effluent in an internal circulation reactor. *Wat. Sci. Technol.*, 35:10, 189-197.
- HALL, E.R. (1982) Biomass retention and mixing characteristics in fixed-film and suspended growth anaerobic reactors *In: Proc. IAWPR Specialized Seminar on Anaerobic Treatment*, Copenhagen, Denmark, 371-396
- HANAKI, K., CHATSANGUTHAI, S., E MATSUO T. (1994) Characterization of accumulated biomass in anaerobic filter treating various types of substrates. *Biores. Technol.*, 47, 275-282.
- HANAKI, K., ISHIKAWA, T. E MATSUO T. (1983) Inhibitory and stimulative effects of oleate on methanogenesis from acetate in anaerobic digestion. *Technol. Rep. Tohoku Univ.*, 48, 123-135.
- HANAKI, K., MATSUO, T. E NAGASE, M. (1981) Mechanisms of inhibition caused by long chain fatty acids in anaerobic digestion process. *Biotechnol. Bioeng.*, 23, 1591-1560.
- HARPER, S.R. E POHLAND F.G. (1997) Microbial consortia selection in anaerobic filters operated in . different reactor configurations. *Wat. Sci. Technol.*, 36, 6-7, 33-40.
- HARPER, S.R. E POHLAND, F.G. (1986). Recent developments in hydrogen management during anaerobic biological wastewater treatment. *Biotechnol. Bioeng.*, 28, 585-602.
- HARPER, S.R. E POHLAND, F.G. (1987). Enhancement of anaerobic treatment efficiency through process modification. *J. Water Pollut. Control Fed.*, 59:3, 152-161.
- HARRIS, M.T. *et al.*, (1985) The loves creek anaerobic upflow (Anflow) pilot plant: performance summary. *EPA-600/S2-85/040*, U.S.EPA, Cincinnati, Ohio (referido em YOUNG, 1991).
- HATTINGH, W.H.J., KOTZÉ, J.P., THIEL, P.G., TOERIEN, D.F. E SIEBERT M.L. (1967) Biological changes during the adaptation of an anaerobic digester to a synthetic substrate. *Wat. Res.*, 1, 255-277.
- HAWKES, F.R., DONNELLY, T. E ANDERSON, G.K. (1995) Comparative performance of anaerobic digesters operating on ice-cream wastewater. *Wat. Res.*, 29, 2, 525-533.
- HEERTJES, P.M. E KUIJVENHOVEN, L.J. (1982) Fluid flow pattern in up-flow reactors for anaerobic treatment of beet sugar factory wastewater. *Biotechnol. Bioeng.*, 24, 443-459.
- HEERTJES, P.M. E VAN DER MEER, R.R. (1978) Dynamics of liquid flow in an up-flow reactor used for anaerobic treatment of wastewater *Biotechnol. Bioeng.*, 20, 1577-1594.
- HEIJNEN, J.J. MULDER, A. ENGER, W. E HOEKS, F. (1986) Review on the application of anaerobic fluidized bed reactors in waste-water treatment. *In: Conference Papers of "Anaerobic Treatment a Grown-Up Technology"*, AQUATEC'86, Industrial Presentations B.V., Schiedam, 159-174.
- HEINZLE, E. (1992) Present and potential applications of mass spectrometry for bioprocess research and control. *J. Biotechnol.*, 25, 81-114.
- HENRY, M.P., DONLON, B.A., LENS, P.N. E COLLERAN, E.M. (1996) Use of anaerobic hybrid reactors for treatment of synthetic pharmaceutical wastewaters containing organic solvents. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 66, 251-264.

- HENZE, M. (1997) Trends in advanced wastewater treatment. *Wat. Sci. Technol.*, 35:10, 1-4.
- HENZE, M. E HARREMÕES, P. (1983) Anaerobic treatment of wastewater in fixed film reactors - a literature review, *Wat. Sci. Technol.*, 15, 1-101.
- HERMANOWICZ S.W., SCHINDLER U. E WILDERER P. (1996) Fractal structure of biofilms: new tools for investigation of morphology. *Wat. Sci. Technol.* 32:8, 99-105.
- HICKEY, R.F. E SWITZENBAUM, S.M. (1988) The role of intermediate and product gases as a regulators and indicators of anaerobic digestion. In: *Poster-Papers 5th Int. Symp. Anaerobic Digestion*, A.Tilche e A. Rozzi (Eds), Bolonha, Italy, 43-47.
- HICKEY, R.F., VANDERWIELEN, J. E SWITZENBAUM, M.S. (1989) The effect of heavy metals on methane production and hydrogen and carbon monoxide levels during batch anaerobic sludge digestion. *Wat. Res.*, 23, 207-218.
- HICKEY, R.F., WU, W.-M., VEIGA, M.C. E JONES, R. (1991) Start-up, operation, monitoring and control of high-rate anaerobic treatment systems. *Wat. Sci. Technol.*, 24:8, 207-255.
- HOBSON, P.N. E WHEATLEY, A.D. (1993) *Anaerobic Digestion: Modern Theory and Practice*. Elsevier Applied Science. London.
- HOLST, T.C., TRUC, A. E PUJOL, R (1997) Anaerobic fluidized beds: ten years of industrial experience. *Wat. Sci. Technol.*, 36, 6-7, 415-422, 1997.
- HOPPE-SEYLER, F. (1876) Pflüger's Arch. F. ges. Physiol. 12, 1. (Referido em ZEHNDER *et al.*, 1982).
- HUANG, J E PINDER, KL (1995). Effect of calcium on development of anaerobic biofilms. *Biotechnol. Bioeng.*, 45, 212-218.
- HULSHOF POL, L., EULER, H., EITNER, A. E GROHGANZ, D. (1997) GTZ sectoral project "Promotion of Anaerobic Technology for the Treatment of Municipal and Industrial Sewage and Waste". In: *Proc. 8th Int. Conf. on Anaerobic Digestion*, Sendai, Japão, Vol. 2, 285-292.
- HULSHOF POL, L.W., DE ZEEUW, W.J., VELZEBOER, C.T.M. E LETTINGA, G. (1983) Granulation in UASB reactor. *Wat. Sci. Technol.*, 15:8/9, 291-304.
- HULSHOFF POL L.W., VAN DE WORP J.J.M., LETTINGA G. E BEVERLO W.A. (1986) Physical characterisation of anaerobic sludge. In: *Conference papers of anaerobic treatment, a grown-up technology, AQUATEC'86*, Industrial presentation B.V., Schiedam, 89-101.
- HULSHOFF POL, L.W. (1989) The phenomenon of granulation of anaerobic sludge. *Ph.D. Thesis*, Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands.
- HUNGATE, R.E. (1969) A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In: *Methods in Microbiology* Vol. 3B, J.R. Norris e D.W. Ribbons (Eds.), Ac. Press Inc, 117-132.
- HUSER, B.A., WUHRMANN, K. E ZEHNDER, A.J.B. (1982) *Methanothrix soehngenii* gen. nov. sp. nov., a new acetotrophic non-hydrogen oxidizing methane bacterium. *Arch. Microbiol.*, 132, 1-9.

- HUYSMAN, P., VAN MEENEN, P., VAN ASSCHE, P. E VERSTRAETE, W. (1983) Factors affecting colonization of non porous and porous packing materials in model upflow methane reactors. *Biotechnol. Letters*, 5, 643-648.
- HWU, C.-S. (1997) Enhancing anaerobic treatment of wastewaters containing oleic acid. *Ph.D. Thesis*, Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands.
- HWU, C.-S., DONLON, B. E LETTINGA, G. (1996 b) Comparative toxicity of long-chain fatty acid to anaerobic sludges from various origins. *Wat. Sci. Technol.*, 34, 5-6, 351-358.
- HWU, C.-S., MOLENAAR, G., GARTHOFF, J., VAN LIER, J.B. E LETTINGA, G. (1997a) Thermophilic high-rate anaerobic treatment of wastewater containing long-chain fatty acids: impact of reactor hydrodynamics. *Biotechnol. Lett.*, 19, 5, 447-451.
- HWU, C.-S., VAN BEEK, B., VAN LIER, J.B. E LETTING, G. (1997b) Thermophilic high-rate anaerobic treatment of wastewater containing long-chain fatty acids: effect of washed out biomass recirculation. *Biotechnol. Lett.*, 19, 5, 453-456.
- HWU, C.-S., VAN LIER, J.B. E LETTINGA, G. (1996 a) Comment on "Interactions between acidogenesis and methanogenesis in the anaerobic treatment of olive oil mill effluents". *Wat. Res.*, 30:9, 2229.
- INANC, B., MATSUI, S. E IDE, S. (1996) Propionic acid accumulation and controlling factors in anaerobic treatment of carbohydrate: effects of H₂ and pH. *Wat. Sci. Technol.*, 34, 317-325.
- INCE, O., ANDERSON, G.K. E KASAPGIL, B. (1995) Control of organic loading rate using the specific methanogenic activity test during start-up of an anaerobic digestion system. *Wat. Res.*, 29, 349-355.
- INCE, O., ANDERSON, G.K. E KASAPGIL, B. (1997) Composition of the microbial population in a membrane anaerobic reactor system during start-up. *Wat. Res.*, 31, 1, 1-10.
- IZA, J., COLLERAN, E., PARÍS, J.M., E WU, W.-M. (1991) International workshop on anaerobic treatment technology for municipal and industrial wastewaters: summary paper. *Water Sci. Technol.*, 24:8, 1-16.
- JACKSON-MOSS, C.A. E DUNCAN, J.R. (1991). The effect of the aluminium on anaerobic digestion. *Biotechnol. Lett.*, 13:2, 143-148.
- JAMES, A., CHERNICHARO, C.A.L. E CAMPOS, C.M.M. (1990). The development of a new methodology for the assessment of specific methanogenic activity. *Wat. Res.*, 24, 7, 813-825.
- JARREL, K.F. E SPROTT, G.D. (1982) Nickel transport in *Methanobacterium bryantii*. *J. Bacteriol.*, 151, 1195.
- JENNETT, J.C. E DENNIS, JR.N.D. (1975) Anaerobic filter treatment of pharmaceutical waste. *J. Water Pollut. Control Fed.*, 47:1, 104-121.
- JERIS, J., E MCCARTY, P.L (1965) The biochemistry of methane fermentation using C14 tracers. *J. Wat Pollut. Control Fed.*, 37:2, 143-148.

- JIMENO, A., BERMUDEZ, J.J., CANOVAS-DIAZ, M., MANJON, A. E IBORRA, J.L. (1990) Methanogenic biofilm growth studies in an anaerobic fixed-film reactor. *Enzyme Microb. Technol.*, 12, 387-394.
- JONES, W.J., NAGLE, D.P. E WHITMAN, W.B. (1987) Methanogens and the diversity of Archaeobacteria. *Microbiol. Rev.*, 51:1, 135-177.
- KAMAGATA, Y. E MIKAMI, E. (1990) Some characteristics of two morphotypes of *Methanothrix soehngenii* from mesophilic anaerobic digesters. *J. Ferm. Bioeng.*, 70:4, 272-274.
- KATINKA (1994) The role of homoacetogenic bacteria in anaerobic digestion. *Internal Report*, University College Galway Ireland.
- KATO, M. (1994) The anaerobic treatment of low strength soluble wastewaters. *Ph.D. Thesis*, Wageningen Agricultural University, The Netherlands.
- KATZEL, J. (1981) Wastewater process returns fuel credits to plant. *Plant Eng.*, 13, 102.
- KELTJENS, J.T. E VAN DER DRIFT, C. (1986) Electron transfer reactions in methanogens. *FEMS Microbiol. Rev.*, 39, 259-303.
- KENNEDY, K.J. E DROSTE, R.L. (1986) Anaerobic fixed-film reactors treating carbohydrate wastewater. *Wat. Res.*, 30, 685-695.
- KIDBY, D.W. E NEDWELL, D. B. (1991) An investigation into the suitability of biogas hydrogen concentration as a performance monitor for anaerobic sewage sludge digesters. *Wat. Res.*, 25, 1007-1012.
- KIENER, A. E LEISINGER, T. (1986) Oxygen sensitivity of methanogenic bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.*, 4, 305-312.
- KIRSOP, B.H. (1984) Methanogenesis. *C.R.C. Crit. Biotechnol. Rev.*, 1, 109-159.
- KOBAYASHI, H.A., MACARIO, E.C., WILLIAMS, R.G. E MACARIO, A.J.L. (1988) Direct characterization of methanogens in two high-rate anaerobic biological reactors. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 3, 693-698.
- KOMATSU, T., HANAKI, K. E MATSUO, T. (1991) Prevention of lipid inhibition in anaerobic processes by introducing a two-phase system. *Wat. Sci. Technol.*, 23, 1189-1200.
- KOSARIC N. E BLASZCZYK R. (1990) Microbial aggregates in anaerobic wastewater treatment. *In: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. vol. 42, A. Fiechter (Ed.) Springer - Verlag, Berlin, 27-62.
- KOSTER, I.W. E CRAMER, A. (1987) Inhibition of methanogenesis from acetate in granular sludge by long-chain fatty acids. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 2, 403-409.
- LAANBROEK, H.J. ABEE, T. E VOOGD, I.L. (1982) Alcohol conversions by *Dessulfobulbus propionicus* Lindhorst in the presence and absence of sulfate and hydrogen. *Arch. Microbiol.*, 133, 178-184.
- LAWRENCE, A.A. (1971). Application of process kinetics to design of anaerobic processes. *Adv. Chem. Ser.*, 105, 163-189.

- LEMA, J.M. E MENDEZ, R.J. (1988) Diseño y operacion de digestores anaerobios basados en conceptos cineticos. *In Actas del 4º Seminario D.A.A.R.*, F.Fdz. Polanco, P.A. Garcia, S. Hernando (Eds.), Univ. Valladolid, 21-39.
- LENS, P.N., O'FLAHERTY, V., DIJKEMA, C., COLLERAN, E. E STAMS, A.J.M. (1996) Propionate degradation by mesophilic anaerobic sludge: degradation pathways and effects of other volatile fatty acids. *J. Ferm. Bioeng*, 82:4, 387-391.
- LETTINGA G., VAN VELSEN A. F. M., HOBMA S. W., DE ZEEUW W. E Klapwijk A. (1980) Use of upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment. *Biotechnol. Bioeng* 22, 699-734.
- LETTINGA, G. (1995) Anaerobic digestion and wastewater treatment. *Antonie van Leeuwenhoek*, 67, 3-28.
- LETTINGA, G. (1996) Sustainable integrated biological wastewater treatment. *Wat Sci. Technol.*, 33:3, 99-110.
- LETTINGA, G., FIELD, J., VAN LIER, J.B., ZEEMAN, G. E HULSHOFF POL, L.W. (1997 b) Advanced anaerobic wastewater treatment in the near future. *Wat Sci Technol.*, 35:10, 5-12.
- LETTINGA, G., HULSHOFF POL, L.W., KOSTER, I.W., WIEGANT, W.M., DE ZEEUW, W.J., RINZEMA, A., GRIN, P.C., ROERSMA, R.E. E HOBMA, S.W. (1984) High-rate anaerobic wastewater treatment using the UASB reactor under a wide range of temperature conditions. *Biotechnol. Eng Rev.*, 2, 253-284.
- LETTINGA, G., HULSHOFF POL, L.W., WIEGANT, W.M., DE ZEEUW, W.J., HOBMA, S.W., GRIN, P.C., ROERSMA, R.E., SAYED, S. E VAN VELSEN, A.F.M. (1983) Upflow sludge blanket process. *In: Proc. Third Int. Symp. Anaerobic Digestion*, Boston, Massachussets, 139-158.
- LETTINGA, G., HULSHOFF POL, L.W., ZEEMAN, G., FIELD, J., VAN LIER, J.B., VAN BUUREN, J.C.L., JANSSEN, A.J.H. E LENS, P. (1997 a) Anaerobic treatment in sustainable environmental production concepts. *In: Proc. 8th Int. Conf. on Anaerobic Digestion*, Sendai, Japão, Vol. 1, 32-39.
- LEVENSPIEL, O. (1972). Chemical Reaction Engineering, John Wiley, New York.
- LEVENSPIEL, O. E SMITH, W.K. (1957) Notes on the diffusion type model for the longitudinal mixing of fluids in flow. *Chem. Eng Sci.*, 6, 227-233.
- LEVENSPIEL, O. E TURNER, J.C.R. (1970) The interpretation of residence time experiments. *Chem. Eng Sci.*, 25, 1605-1609.
- LI D.H. E GANCZARCZYK J.J. (1989) Fractal geometry of particle aggregates generated in water and wastewater treatment processes. *Environ. Sci. Technol.* 23, 1385-1389.
- LI, Y.Y., FANG, H.H.P. E NOIKE, T. (1994) Recent developments in microbiology and biochemistry of homoacetogens and syntrophic acetogens. *In: Proc. 7th Int. Symp. on Anaerobic Digestion*, Poster Papers Preprints Cape Town, South Africa, p 54-57.
- LIN, C.-Y. (1992) Effect of heavy metals on volatile fatty acid degradation in anaerobic digestion. *Wat. Res.*, 26, 177-183.
- LIU, B.Y.M. PFEFFER, J.T. E SUIDAN, M.T. (1991) Loading capacity of a packed-bed anaerobic reactor. *J. Wat. Pollut. Control Fed.*, 63:2, 145-152.

- LOBO, A.L. E ZINDER, S.H. (1988) Diazotrophy and nitrogenase activity in the archaeobacterium *Methanosarcina barkeri*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 1656-1661.
- LOVLEY, D.R. E KLUG, M.J. (1983) Methanogenesis from methanol and methylamines and acetogenesis from hydrogen and carbon dioxide in the sediments of a eutrophic lake. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45, 1310-1315.
- MACARIO, A.J.L. E MACARIO, E.C. (1985) Antibodies for methanogenic biotechnology. *Trends Biotechnol.*, 3-204-208.
- MACKIE, R.I. E BRYANT, M.P. (1981) Metabolic activity of fatty acid oxidising bacteria and the contribution of acetate, propionate, butyrate and CO to methanogenesis in cattle waste at 40 and 60 °C. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41, 1363-1373.
- MADONI, P. E GHETTI, P.F. (1981) The structure of ciliated protozoa communities in biological sewage treatment plants. *Hydrobiol.*, 83, 207-215.
- MAESTROJUÁN, G.M. E FIESTAS, J.A. (1988) A study of the behaviour of anaerobic bacteria in the presence of diverse materials usable as support. In: *Poster-Papers 5th Int. Symp. Anaerobic Digestion*, A. Tilche and A. Rozzi (Eds.), Bolonha, Italy, 129-132.
- MAH, R.A. E SUSSMAN, C. (1968) Microbiology of anaerobic sludge fermentation. 1. Enumeration of the non-methanogenic anaerobic bacteria. *Applied Microbiol.*, 16, 358.
- MAH, R.A., SMITH, M.R., FERGUSON, T. E ZINDER, S. (1981). Methanogenesis from H₂-CO₂, methanol, and acetate by *Methanosarcina*. In *Methabolism and Growth Physiology of Methanogens*, 131-144.
- MAKKONEN, O.H.P. (1953) Sand filter for use with septic tank. In: Design and Operation of Septics Tanks, *WHO Monograph series*, nº 18, 107-109.
- MANDELBROT B.B. (1982) The fractal geometry of nature. W.H. Freeman, San Francisco, California.
- MARCHAIM, U. E KRAUSE, C. (1993) Propionic to acetic acid ratios in overloaded anaerobic digestion. *Biores. Technol.*, 43, 195-203.
- MARQUARDT, J.D. (1963) An algorithm for least-squares estimation of non-linear parameters. *J. Soc. Indust. Appl. Math.*, 11:2, 431-441.
- MARQUES, I.P.R. (1988) Estudo da aplicação do filtro anaeróbio à conversão do efluente suínico em biogás. *Provas para Assistente de Investigação*, DER, LNETI, Lisboa.
- MARSHAL, K.C. E GOODMAN, A.E. (1994) Effects of adhesion on microbial cell physiology. *Coll. and Surf. B: Biointerf.*, 2, 1-7.
- MAWSON, A.J., EARLE, R.L. E LARSEN, V.F. (1991) Degradation of acetic and propionic acids in the methane fermentation. *Wat. Res.*, 25, 1549-1554.
- MCCARTY, P.L. (1964) Anaerobic waste treatment fundamentals. *Part 3. Public Works*, 91-94.

- MCINERNEY, M.J., BRYANT, M.P., HESPELL, R.B. E COSTERTON, J.W. (1981) *Syntrophomonas wolfii* gen. nov. sp., an anaerobic, syntrophic, fatty acid oxidizing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 41, 4, 1029-1039.
- MEIER-SCHNEIDERS, M., BUSCH, C. E DIEKERT, G. (1993) The attachment of bacterial cells to surfaces under anaerobic conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38, 667-673.
- MESSING, R.A. E OPPERMAN, R.A. (1979) Pore dimensions for accumulating biomass. I. microbes that reproduce by fission or by budding. *Biotechnology and Bioengineering* 21, 49-58.
- MIKAMI, E., WATANABE, H., INOUE, Y., HAGA, K. E INAMORI, Y. (1997) Trends of anaerobic digestion in Japan. *In: Proc. 8th Int. Conf. on Anaerobic Digestion*, Sendai, Japão, Vol. 2, 293-300.
- MILLER, T.L. E WOLIN, M.J. (1974) A serum bottle modification of the Hungate technique for cultivating Obligate anaerobes. *Appl. Microbiol.*, 27:5, 985-987.
- MINK, R.W. E DUGAN, P.R. (1977) Tentative identification of methanogenic bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33, 3, 713-717.
- MOLETTA, R. E ALBAGNAC, G. (1982). A gas meter for low rates of gas flow: Application to the methane fermentation. *Biotechnol. Lett.*, 4, 5, 319-322.
- MONROY, O., MERAZ, M., MONTOYA, L., FAMÁ, G. E MACARIE, H. (1997) Anaerobic digestion in Mexico *In: Proc. 8th Int. Conf. on Anaerobic Digestion*, Sendai, Japão, Vol. 2, 272-284.
- MONTEITH, H.D. E STEPHENSON, J.P. (1981) Mixing efficiencies in full-scale anaerobic digesters by tracer methods. *J. Wat. Pollut. Control Fed.*, 53, 78-84.
- MORGAN, J.W., EVISON, L.M. E FORSTER, C.F. (1991) Changes to the microbial ecology in anaerobic digesters treating ice cream wastewater during start-up. *Wat Res.*, 25, 6, 639-653.
- MOSEY, F.E. (1983) Mathematical modelling of the anaerobic digestion process: regulatory mechanisms for the formation of short-chain volatile acids from glucose, *Wat. Sci. Technol.*, 15, 209-232.
- MOSEY, F.E. E FERNANDEZ, X.A. (1984) Mathematical modelling of methanogenesis in sewage sludge digestion. *In: Microbiological Methods for Environmental Biotechnology*, J.M. Graincher, J.M. Lynch (Eds.), Academic Press, New York 159-168.
- MOTA, M., BESLE, J.M., STREHAIANO, P. E GOMA, G. (1987). A simple device for fed-batch control in alcoholic fermentation. *Biotechnol. Bioeng.*, 29, 775-777.
- MOUNTFORD, D.O. E ASHER, R.A. (1979) Effect of inorganic sulfide on the growth and metabolism of *Methanosarcina barkeri* strain DM. *Appl. Environ. Microbiol.*, 37, 670-675.
- MOZES, N., LEONARD, A.J. E ROUXHET, P.G. (1988) On the relation between the elemental surface composition of yeasts and bacteria and their charge and hydrophobicity. *Biochem. Biophys. Acta*, 945, 324-334.

- MUELLER, J.A. E MANCINI, J.L. (1975) Anaerobic filter - kinetics and applications. *In: Proc 30th Purdue Industrial Waste Conference*, Ann. Arbor Science Publ. Inc., Ann. Arbor, Michigan, USA, 423-447.
- MUÑOZ, M.A., SANCHEZ, J.M., RODRIGUEZ-MAROTO, J.M., MORIÑIGO, M.A. E BORREGO, J.J. (1994) Evaluation of the use of sepiolite to optimize the methanogenesis from anaerobic domestic sludges in laboratory conditions. *Wat. Res.*, 28:1, 195-200.
- MURRAY, W.D. E VAN DEN BERG, L. (1981 a) Effects of nickel, cobalt and molibdenium on performance of methanogenic fixed film reactor. *Appl. Environ. Microbiol.*, 42:3, 502-505.
- MURRAY, W.D. E VAN DEN BERG, L. (1981 b) Effect of support material on the development of microbial fixed films converting acetic acid to methane. *J. Appl. Bacteriol.* 51, 257-265.
- NACHAIYASIT, S. E STUCKEY, D.C. (1995) Microbial response to environmental changes in an anaerobic baffled reactor (ABR). *Antonie van Leeuwenhoek*, 67, 111-123.
- NÄHLE, C. (1991) The contact process for the anaerobic treatment of wastewater: technology design and experiences. *Wat. Sci. Technol.*, 24:8, 179-191.
- NORRMAN, J. (1983) Treatment of block liquor condensate from a pulp mill in an anaerobic filter and an expanded bed. *In: Proc. IAWPR Specialized Seminar on Anaerobic Treatment*, Copenhagen, Denmark.
- NOVAK, J.T. E CARLSON, D.A. (1970) The kinetics of anaerobic long chain acid degradation. *J. Wat. Pollut. Control Fed.*, 42, 1932-1943.
- NOZHEVNIKOVA, A.N, HOLLIGER, C., AMMANN, A. E ZEHNDER, A.J.B. (1997) Methanogenesis in sediments from deep lakes at different temperatures (2-70 °C). *Wat. Sci. Technol.*, 36:6-7, 57-64.
- NOZHEVNIKOVA, A.N. E CHUDINA, V.I. (1985) Morphology of the thermophilic acetate methane bacterium *Methanothrix thermoacetophila* sp. Nov. *Microbiology (Engl Transl. Mikrobiologiya)*, 53, 618-624.
- NYNS, E.J. (1994) A guide to successful industrial implementation of biomethanisation technologies. *The Institute Wallon*, Namur, Belgium for the European Commission DGXVII.
- OHWAKI, K. E HUNGATE, R.E. (1977) Hydrogen utilization by Clostridia in sewage sludge. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33, 1270-1274.
- OLESZKIEWICZ, J.A. E SHARMA, V.K. (1990) Stimulation and inhibition of anaerobic processes by heavy metals - a review. *Biol. Wastes.*, 31, 45-67.
- OLESZKIEWICZ, J.A. E THANDANI, V.J. (1988) Effects of biofilter media on the performance of anaerobic hybrid reactors. *Environ. Technol. Lett.*, 9, 89-100.
- OLIVEIRA MARQUES, F. J. E DI BERARDINO, S. (1991) Instalações de biogás do sector agro-pecuário existentes em Portugal. *Energia Solar e Biogás*, 67-74.

- OLTHOF, M. E OLESZKIEWICZ, J.A. (1983) Anaerobic treatment of industrial wastewaters. *In: Process Technology and Flowsheets*, Vol II, Chemical Engineerig, McGraw-Hill Publ. Co, New York, p 242-247.
- OMELIANSKI, W. (1904) *Centralbl. f. Bakt. Abt. II*, 11, 369. (referido em ZEHNDER *et al.*, 1982)
- OMELIANSKI, W. (1916) *Ann. Inst.Past.*, 30, 56. (referido em ZEHNDER *et al.*, 1982)
- OREMLAND, R.S E CAPONE, D.G. (1988) Use of "specific" inhibitors in biogeochemistry and microbial ecology. *Adv. Microbiol. Ecol.*, 10, 285-383.
- OREMLAND, R.S. (1988). Biogeochemistry of methanogenic bacteria. *In: Biology of Anaerobic Microorganisms*, Alexander J.B. Zehnder (Ed.) John Wiley & Sons, New York, 641-705.
- OWEN, W.F., STUCKEY, D.C., HEALY, J.B., YOUNG, L.Y. E MCCARTY, P.L. (1979) Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. *Wat. Res.*, 13, 485-492.
- PAN VEIRA, L.M. (1991). Tratamiento de efluentes de industrias lacteas en reactores anaerobios de alta carga: influencia de la relacion C/N/P y del equipo. *Dissertação de Doutorado*, Universidad de Santiago de Compostela, Departamento de Ingeniería Química.
- PARIS, J.M., LEMA, J.M. E CASAS, C. (1983) Criterios de selección de tecnología en la digestión anaerobia de aguas residuales. *Ingeniería Química*, Octubre, 143-149.
- PARKIN, G.F. E OWEN, W.F. (1986) Fundamentals of anaerobic digestion of wastewater sludges, *J. Environ. Eng. Div. ASCE*, 112:5, 867-919.
- PATEL, G.B. (1984) Characterization and nutritional properties of *Methanothrix concilli* sp. Nov., a mesophilic acetoclastic methanogen. *Can J. Microbiol.*, 30, 1383-1396.
- PATEL, G.B. E SPROTT, D. (1990) *Methanosaeta concilli* gen. nov., sp. nov. ("Methanothrix concilli") and *Methanosaeta thermoacetophil* nom. re., comb. nov.. *Intl J. System. Bacteriol*, 40:1, 79-82.
- PAUSS, A., GUIOT, S. E SAMSON, R. (1988) Sensors for anaerobic digestion management. *In: Poster-Papers 5th Int. Symp. Anaerobic Digestion*, A.Tilche e A. Rozzi (Eds), Bolonha, Italy, 223-226.
- PAVLOSTATHIS, S.G. E GIRALDO-GOMEZ (1991) Kinetics of anaerobic treatment. *Wat. Sci. Technol.*, 24, 8, 35-59.
- PERLE, M., KIMCHIE, S. E SHELEF, G. (1995) Some biochemical aspects of the anaerobic degradation of dairy wastewater. *Wat. Res.*, 29, 1549-1554.
- PETROZZI, S., DUNN, I.J., HEINZLE, E. E KUT, O.M. (1991) Carrier influence in anaerobic biofilm fluidized beds for treating vapor condensate from the sulfite cellulose process. *Can J. Chem. Eng.*, 69, 527-553.
- PIERZO, V., BELLAHCEN, D., FONTVIEILLE, D., LAZAROVA, V., HUYARD, A. AND MANEM, J. (1994) Improved procedure for wastewater biofilm removal and analysis. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2, 577-584.
- POPOFF, L. (1875) *Pflüger's Arch. f. ges. Physiol.*, 10, 113. (referido em ZEHNDER *et al.*, 1982)

- PRENSIER, G., DUBOURGUIER, H.C., THOMAS, I., ALBAGNAC, G. E BUISSON, M.N. (1987) Specific immunological probes for studying the bacterial associations in granules and biofilms. *In: Proc of Granular Anaerobic Sludge, Microbiology and Technology (GASMAT)*, Lunteren, Netherlands, 55-61.
- QUÉMÉNEUR, M. E MARTY, Y. (1994) Fatty acids and sterols in domestic wastewaters. *Wat. Res.*, 28, 1217-1226.
- RAJU, N.R., DEVI, S.S. E NAND, K. (1991) Influence of trace elements on biogas production from mango processing waste in 1.5 m³ Kvic digesters. *Biotechnol. Lett.*, 13:6, 461-464.
- RAZO-FLORES, E., LUIJTEN, M., DONLON, B., LETTINGA, G. E FIELD, J. (1997) Biodegradation of selected azo-dyes under methanogenic conditions. *Wat. Sci. Technol.*, 36, 6-7, 65-72.
- RENARD, P., VAN BREUSEGEM, V., NGUYEN, M.-T., NAVEAU, H. E NYNS, E.-J. (1991) Implementation of an adaptive controller for the startup and steady-state running of a biomethanation process operated in the CSTR mode. *Biotechnol. Bioeng.*, 38, 8, 805-812.
- REYNOLDS, P.J. (1986) Support Matrix and Feed Flow Effects in Anaerobic Fixed Bed Reactors. *PhD Thesis*, University College, Galway, Ireland.
- REYNOLDS, P.J. E COLLERAN, E. (1986) Comparison of start-up and operation of anaerobic fixed-bed and hybrid sludge-bed/fixed-bed reactors treating whey wastewater. *In: Conference papers of anaerobic treatment, a grown-up technology, AQUATEC'86*, Industrial presentation B.V., Schiedam, 515-531.
- RIEDEL, K.H.J. E BRITZ, T.J. (1993) Propionibacterium species diversity in anaerobic digesters. *Biodivers. Conserv.*, 2, 400-411.
- RIERA, F.S. VALZ-GIANINETI, S., CALLIERI, D. E SENERIZ, F. (1982) Use of a packed-bed reactor for anaerobic treatment of stillage of sugar cane molasses. *Biotechnol. Lett.*, 4, 127-132.
- RINZEMA, A., ALPHENAAR, A. E LETTINGA, G. (1989) The effects of lauric acid shock loads on the biological and physical performance of granular sludge in UASB reactors digesting acetate. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 46, 257-266.
- RINZEMA, A. (1988) Anaerobic treatment of wastewater with high concentration of lipids or sulfate. *Ph.D. Thesis*, Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands.
- RINZEMA, A., BOONE, M., VAN KNIPPENBERG, K. E LETTINGA, G. (1994) Bactericidal effect of long chain fatty acids in anaerobic digestion. *Wat. Environ. Res.*, 66:1, 40-49.
- RITTMANN, B.E., STRUBLER, C.E. E RUZICKA, T. (1982) Anaerobic-filter pretreatment kinetics. *J. Environ. Eng. Div. ASCE*, 108, 900-912.
- ROY, F., SAMAIN, E., DUBOURGUIER, H.C. E ALBAGNAC, G. (1986) *Syntrophomonas sapovorans* sp. nov., a new obligately proton reducing anaerobe oxidizing saturated and unsaturated long chain fatty acids. *Arch. Microbiol.*, 145, 142-147.
- ROY, F., ALBAGNAC, G. E SAMAIN, E. (1985) Influence of calcium addition on growth of highly purified syntrophic cultures degrading long chain fatty acids. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, 3,

- ROZZI, A. (1988) Estado del arte de la digestion anaerobia en Europa. *In: Actas del 4º Seminario D.A.A.R.*, F. Fdz. Polanco, P.A. Garcia, S. Hernando (Eds.), Univ. Valladolid, 11-20.
- RUIZ, I. VEIGA, M.C., DE SANTIAGO, P., E BLÁZQUEZ, R. (1997) Treatment of slaughterhouse wastewater in a UASB reactor and an anaerobic filter. *Biores. Technol.*, 60, 251-258.
- SAKHAROVA, Z.V. E RABOTNOVA, I.L. (1976) Effects of pH on physiological and biochemical properties of chemostatic culture of *Bacillus megaterium*. *Mikrobiologiya (Engl Transl)*, 46, 15-21.
- SALKINOJA-SALONEN, M.S., NYNS, E.J., SUTTON, P.N., VAN DEN BERG, L. E WHEATLEY, A.D. (1983) Starting-up of anaerobic fixed-film reactors. *Wat. Sci. Technol.*, 15, 305-308.
- SALVADÓ, H. E GARCIA, P.M. (1993) Determination of organic loading rate of activated sludge plants based on protozoan analysis. *Wat. Res.*, 27:5, 891-895.
- SAMSON, R., VAN DEN BERG, B., PETERS, R. E HADE, C. (1985 a) Dairy waste treatment using industrial-scale fixed-film and upflow sludge bed anaerobic digesters: design and start-up experience. *In: Proc. 39th Purdue Industrial Waste Conference*, Bell, J.M. (Ed.), Butterworth Publ., Boston, 235-241.
- SAMSON, R., VAN DEN BERG, L. E KENNEDY, K.J. (1985 b) Mixing characteristics and start-up of anaerobic downflow stationary fixed film (DSSF) reactors. *Biotechnol. Bioeng.*, 27, 10-19, 1985.
- SAM-SOON, P., LOEWENTHAL, R.E., WENTZEL, M.C. E MARAIS, G.V.R. (1991) A long-chain fatty acid, oleate, as sole substrate in upflow anaerobic sludge bed (UASB) reactor systems. *Water SA*, 17, 1, 31-36.
- SÄRNER, E. (1986) Influence and control of H₂S on full-scale plants and pilot plant experiments. *In Conference Papers of "Anaerobic Treatment a Grown-Up Technology", AQUATEC'86*, Industrial Presentations B.V., Schiedam, 189-204.
- SAYED, S., VAN CAMPEN, L. E LETTINGA, G. (1987) Anaerobic treatment of slaughterhouse waste using a granular sludge UASB reactor. *Biological Wastes*, 21,11-28.
- SCHERER, P., LIPPERT, M. E WOLFF, G. (1983) Composition of the major elements and trace elements of 10 methanogenic bacteria determined by inductively coupled plasma emission spectrometry. *Biol. Trace Element Res.*, 5, 149-163.
- SCHINK, B. (1988) Principles and limits of anaerobic degradation: environmental and technological aspects. *In Biology of Anaerobic Microorganisms*, Alexander J. B. Zehnder (Ed.), John Wiley & Sons, New York, 771-846.
- SCHINK, B. E THAUER, R.K. (1988) Energetics of syntrophic methane formation and the influence of aggregation. *In Proc. Granular Anaerobic Sludge: Microbiology and Technology (GASMAT) Workshop*, G. Lettinga, A.J.B. Zehnder, J.T.C. Grotenhuis, L.W. Hulshoff Pol (Eds.), Puduc Wageningen, Wageningen, 5-17.
- SCHMIDT J.E. E AHRING B.K. (1996) Granular sludge formation in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Biotechnol. Bioeng* 49, 229-246.
- SCHNELLEN, CH.G.T.P. (1947) *Dissertation*, Tech. Univ. Delft. (referido em ZEHNDER *et al.*, 1982)

- SCOTT, R.I., WILLIAMS, T.N., WHITMORE, T.N. E LLOYD, D. (1983) Direct measurement of methanogenesis in anaerobic digestors by membrane inlet mass spectrometry. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 18, 236-241.
- SHELTON, D.R. E TIEDJE, J.M. (1984) General method for determining anaerobic biodegradation potential. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47, 4, 850-857.
- SMITH, L.C., ELLIOT, D.J. E JAMES, A. (1996) Mixing in upflow anaerobic filters and its influence on performance and scale-up. *Wat. Res.*, 30, 3061-3073.
- SMITH, P.H. E HUNGATE, R.E. (1958) *J Bacteriol*, 75, 713. (referido em ZEHNDER *et al.*, 1982)
- SÖHNGEN, N.L. (1906) *Dissertation*, Tech. Univ. Delft. (referido em ZEHNDER *et al.*, 1982).
- SONG, K.-H. E YOUNG, J.C. (1986) Media design factors for fixed-bed filters. *J. Water Pollut. Control Fed.*, 58:2, 115-121.
- SORENSEN, A.H. E AHRING, B.K. (1993) Measurements of the specific methanogenic activity of anaerobic digester biomass. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 40, 427-431.
- SOTO, M., MÉNDEZ, R. E LEMA, J.M. (1992) Characterization and comparison of biomass from mesophilic and thermophilic fixed bed anaerobic digesters. *Wat. Sci. Technol.*, 25:7, 203-212.
- SOTO, M., MENDEZ, R. E LEMA, J.M. (1993) Methanogenic and non-methanogenic activity tests. theoretical basis and experimental set up. *Wat. Res.*, 27, 1361-1376.
- SOUSA, M., AZEREDO, J., FEIJÓ, J. E OLIVEIRA, R. (1997) Polymeric supports for the adhesion of a consortium of autotrophic nitrifying bacteria. *Biotechnol. Tech.*, 11, 10, 751-754.
- SPEECE, R., DURAN, M., DEMIRER, G., ZHANG, H., E DISTEFANO, T. (1997) The role of process configuration in the performance of anaerobic systems. In: *Int. Proc. 8th Int.Conf. on Anaerobic Digestion*, Sendai, Japão, Vol. 1, 1-8.
- SPEECE, R.E. (1983) Anaerobic biotechnology for industrial wastewater treatment. *Eviron. Sci. Technol.*, 17:9, 416-427
- SPEECE, R.E. E MCCARTY, P.L. (1964) Nutrient requirements and biological solids accumulation in Anaerobic digestion. *Adv. Wat. Pollut. Res.*, 2, 305-322.
- SPEECE, R.E. E PARKIN, G.F. (1983) The response of methane bacteria to toxicity. In: *Proc. Third International Symposium on Anaerobic Digestion* Boston, Massachussets, p 23-35.
- STADTMAN, T.C. (1967) *Ann. Rev. Microbiol.*, 21, 121. (referido em ZEHNDER *et al.*, 1982)
- STAMS, A.J.M. (1994) Metabolic interactions between anaerobic bacteria in methanogenic environments. *Antonie van Leeuwenhoek*, 66, 271-294.
- STAMS, A.J.M., VAN DIJK, J.B., DIKEMA, C. E PLUGGE, C. (1993) Growth of syntrophic-oxidizing bacteria with fumarate in the absence of methanogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 1114-1119.

- STRONACH, S.M. RUDD, T. E LESTER, J.N. (1987) Start-up of anaerobic bioreactors on high strength industrial wastes. *Biomass*, 13, 173-197.
- STRYER, L. (1981) *Biochemistry*. 2nd Ed, W.H.Freeman & Co., New York.
- SWITZENBAUM, M.S. E JEWELL, W.J. (1980) Anaerobic attached-film expanded bed reactor treatment. *J. Water Pollut. Control Fed.*, 52:7, 1953-1965.
- SZENDREY, L.M. (1983) Start-up and operation of the Bacardi Corporation anaerobic filter. *In: Proc Third Int. Symp. Anaerobic Digestion*, Boston, Massachussets, 365-377.
- TAKASHIMA, M. E SPEECE, R.E. (1989) Mineral requirements for high-rate methane fermentation of acetate at low SRT. *J. Wat. Pollut. Control Fed.*, 61, 1645-1650.
- TAKASHIMA, M. E SPEECE, R.E. (1990) Mineral requirements for methane fermentation. *Crit. Rev. Env. Control*, 19:5, 465-479.
- THAVEESRI, J., BOUCNEAU, G., GERNAEY, K., KAONGA, B. E VERSTRAETE, W. (1994) Organic and amonia nitrogen in relation to granular sludge growth. *Wat. Sci. Technol.*, 30, 12, 43-54.
- THEOLEYRE, M.A. E MLAOUHI, A. (1988) Using a chemical tracer to determine the real retention time of a digester. *In: Poster-Papers 5th Int. Symp. Anaerobic Digestion*, A. Tilche e A. Rozzi (Eds), Bolonha, Italy, 243-246.
- THIELE, J.H. E ZEIKUS, J.G. (1988) Interactions between hydrogen-and-formate-producing bacteria and methanogens during anaerobic digestion. *In Handbook on Anaerobic Fermentations*, Larry E. Erickson, Daniel Yee-Chak Fung (Eds.), New York, 537-595.
- THOLOZAN, J.L., SAMAIN, E., GRIVET, J.P., MOLETTA, R., DUBOURGUIER, H.C. E ALBAGNAC, G. (1988) Reductive carboxylation of propionate to butyrate in methanogenic ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 441-445.
- TOMEI, F.A., MAKI, J.S. E MITCHELL, R. (1985) Interactons in syntrophic associations of endospore-forming, butyrate degrading and H₂-consuming bacteria. *Appl. Env. Microbiol.*, 50, 1244.
- TRIT, W.P. (1992) The anaerobic treatment of slaughterhouse wastewater in fixed-bed reactors. *Biores. Technol.*, 41, 201-207.
- VALCKE, D. E VERSTRAETE, W. (1983) A pratical method to estimate the acetoclastic methanogenic biomass in anaerobic sludges. *J. Wat. Pollut. Control. Fed.*, 55, 1191-1195.
- VALENTINI, A., GARUTI, G., ROZZI, A. E TILCHE, A. (1997) Anaerobic degradation kinetics of particulate organic matter: a new approach. *Wat. Sci. Technol.*, 36, 6-7, 239-246.
- VAN BRUGGEN, J.J.A., STUMM, C.K. E VOGELS, G.D. (1983) Symbiosis of methanogenic bacteria and sapropelic protozoa. *Arch. Microbiol.*, 136, 89-95.
- VAN BRUGGEN, J.J.A., ZWART, K.B., HERMANS, J.G.F., VAN HOVE, E.M., STUMM, C.K. E VOGELS, G.D. (1986) Isolation and characterization of *Methanoplanus endosymbiosus* sp. nov., an endosymbiont of the marine sapropeliciliate *Metopus contortus* Quennerstedt. *Arch. Microbiol.*, 144, 367-374.

- VAN BRUGGEN, J.J.A., ZWART, K.B., VAN ASSEMA, R.M., STUMM, C.K. E VOGELS, G.D. (1984) *Methanobacterium formicicum*, an endosymbiont of the anaerobic ciliate *Metopus striatus* McMurrich. *Arch. Microbiol.*, 139, 1-7.
- VAN DEN BERG, L. E KENNEDY, K.J. (1981) Support materials for stationary fixed-film reactors for high rate methanogenic fermentation. *Biotechnol. Lett.*, 3, 165.
- VAN DEN BERG, L. E KENNEDY, K.J. (1983) Dairy waste treatment with anaerobic stationary fixed film reactors. *Wat. Sci. Technol.*, 15, 359-368.
- VAN DEN BERG, L. E LENTZ, C.P. (1979) Comparison between up and downflow anaerobic fixed-film reactor of various surface-to-volume ratios for the treatment of bean blanching waste. *In: Proc. of 34th Purdue Industrial Waste Conference*, Ann Arbor Science Publishers Inc, 319-325.
- VAN DER MERVE, M. E BRITZ, T.J. (1993) Anaerobic digestion of baker's yeast factory effluent using an anaerobic filter and a hybrid digester. *Biores. Technol.*, 43, 169-174.
- VAN EEKERT, M.H.A., VEIGA, M.C., FIELD, J.A., STAMS, A.J.M. E SCHRAA, G. (1995) Removal of tetrachloromethane by granular methanogenic sludge. *In: R.E. Hinchee, A. Leeson e S. Semprini (Eds.), Bioremediation of Chlorinated Solvents*, Batelle Press, Columbus, Ohio, USA, 139-144.
- VAN LIER, J.B., BOERSMA, F., DEBETS, M.M.W.H. E LETTINGA, G. (1994). High rate thermophilic anaerobic wastewater treatment in compartmentalized upflow reactors. *Wat. Sci. Technol.*, 30, 251-261.
- VAN LIER, J.B., GROENEVELD, N. E LETTINGA, G. (1996). Development of thermophilic methanogenic sludge in compartmentalized upflow reactors. *Biotechnol. Bioeng.*, 50, 115-124.
- VAN LIER, J.B., REBAC, S., LENS, P., VAN BIJNEN, F., STEFANIE, J.W., ELFERINK, H.O., STAMS, A.J.M. E LETTINGA, G. (1997). Anaerobic Treatment of partly acidified wastewater in a two-stage expanded granular sludge bed (EGSB) system at 8 °C. *Wat. Sci. Technol.*, 36, 6-7, 317-324.
- VEIGA, M.C., PAN, M., BLASQUEZ, R., MENDEZ, R. E LEMA, M. (1994) A double-feed anaerobic filter for the treatment of high strength wastewaters. *Biotechnol. Tech.*, 8, 2, 77-82.
- VEIGA, M.C., SOTO, M., MÉNDEZ, R. E LEMA, J.M. (1990) A new device for measurement and control of gas production by bench scale anaerobic digesters. *Wat. Res.*, 24, 12, 1551-1554.
- VERRIER, D., MORTIER, B., DUBOURGUIER, H.C. E ALBAGNAC, G. (1988) Adhesion of anaerobic bacteria to inert supports and development of anaerobic biofilms. *In: Proc. 5th Int. Symp. on Anaerobic Digestion*, E.R. Hall, P.N. Hobson (Eds.) Pergamon Press, New York, 61-69.
- VERSTRAETE, W. E VANDEVIVERE, P. (1997) Broader and newer applications of anaerobic digestion. *In: Proc. 8th Int. Conf. Anaerobic Digestion*, Sendai, Japão, Vol. 1, 67-74.
- VIEIRA, M.J., MELO, L.F., PINHEIRO, M.M. (1993) Biofilm formation: Hydrodynamic effects on internal diffusion and structure. *Biofouling* 7, 67-80.
- VIRARAGHAVAN, T. E KIKKERI, S.R. (1990) Effect of temperature on anaerobic filter treatment of dairy wastewater. *Wat. Sci. Technol.*, 22:9, 191-198.

- VIRARAGHAVAN, T. LANDINE, R. C. E PYKE, S. R. (1989) Anaerobic filters for municipal wastewater treatment. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 46, 71-76.
- VOGELS, G.D., KELTIJENS, J.T. E VAN DER DRIFT, C. (1988) Biochemistry of methane production. In *Biology of Anaerobic Microorganisms*, Alexander J.B. Zehnder (Ed.) John Wiley & Sons, New York, 707-770.
- WANG, S.-D. E WANG, D.I.C. (1988) Pore dimension effects in the cell loading of a porous carrier. *Biotechnol. Bioeng.*, 33, 915-917.
- WATSON-CRAICK, I.A. E STAMS, A.J.M. (1995) Guest editorial. *Antonie van Leeuwenhoek*, 67, 1-2.
- WEILAND, P. (1987) Development of anaerobic filters for treatment of high strength agro-industrial wastewaters. *Bioproc. Eng.*, 2, 39-47.
- WEILAND, P. E ROZZI, A. (1991) Start-up, operation, monitoring and control of high-rate anaerobic treatment systems: Discussor's Report. *Water Sci. Technol.*, 24, 8, 257-277.
- WEILAND, P. E THOMSON, H. (1990) Operational behaviour of an industrial fixed bed reactor for biomethanation of alcohol slop from different crops. *Wat. Sci. Technol.*, 22, 1/2, 385-394.
- WENG, C.-N. E JERIS, J.S. (1976) Biochemical mechanisms in the methane fermentation of glutamic and oleic acids. *Wat. Res.*, 10, 9-18.
- WHEATLEY, A.D., FISHER, M.B. E GROBICKI, A.M.W. (1997) Applications of anaerobic digestion for the treatment of industrial wastewaters in Europe. *J. CIWEM*, 11, 39-46.
- WILKIE, A. (1984) Upflow anaerobic digestion of pig slurry. *Ph.D. Thesis*, National University of Ireland, Ireland.
- WILKIE, A. E COLLERAN, E. (1984) Start-up of anaerobic filters containing different supports materials using pig slurry supernatant. *Biotechnol. Lett.*, 6, 735-740.
- WOESE, C.R., KANDLER, O. E WHEELIS, M.L. (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archea, Bacteria and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 4576-4579.
- WOLFE, R.S. (1971) Microbial formation of methane. *Adv. Microbiol. Physiol.*, 6, 107-146.
- WOLFE, R.S. (1992) Biochemistry of methanogenesis. In: *The Archaeobacteria: Biochemistry and Biotechnology*, *Biochem. Soc. Symp.*, nº 58, 41-49.
- WOLIN, M.J. (1974) Metabolic interactions among intestinal microorganisms. *American J. of Clinical Nutrition*, 27, 1320-1334.
- YANG, J. E SPEECE, R.E. (1986) The effects of chloroform toxicity on methane fermentation. *Wat. Res.*, 20, 1273-1279.
- YEE, C.J. (1990) Effects of microcarriers on performance and kinetics of the anaerobic fluidized bed biofilm reactor, *Ph.D. Thesis*, University of Pennsylvania, Philadelphia, U.S.A..

- YODA M. E NISHIMURA S. (1997) Controlling granular sludge floatation in UASB reactors. *In: Proc. 8th Int. Conf. Anaerobic Digestion*, Sendai, Japão, Vol. 3, 579-586.
- YOUNG, H.W. E YOUNG, J.C. (1988). Hydraulic characteristics of upflow anaerobic filters. *J. Envir. Eng Div. ASCE*, 114:3, 621-638.
- YOUNG, J. C. (1983) The anaerobic filter - past, present and future. *In: Proc. Third Int. Symp. on Anaerobic Digestion*, Boston, Massachussets, 91-105.
- YOUNG, J.C. (1991) Factors affecting the design and performance of upflow anaerobic filters. *Water Sci. Technol.*, 24:8, 133-155.
- YOUNG, J.C. E DAHAB, M.F. (1983) Effect of media design on the performance of fixed-bed anaerobic reactors. *Wat. Sci. Technol.*, 15, 369-383.
- YOUNG, J.C. E YANG, B.S. (1989) Design considerations for full-scale anaerobic filters. *J. Wat. Pollut. Control Fed.*, 61:9, 1576-1587.
- YOUNG, J.C. E YOUNG, H.W. (1991) Full-scale treatment of chemical process wastes using anaerobic filters. *J. Wat. Pollut. Control Fed.*, 63:2, 153-159.
- YOUNG, J.C. E MCCARTY, P.L. (1967) The anaerobic filter for waste treatment. *In: Proc. 22nd. Ind. Waste Conf.*, Purdue University, 559-575.
- ZÁBRANSKÁ, J. E DOHÁNYOS, M. (1987) Methods of investigation of the methabolism of anaerobic microorganisms. *Acta Hidrochim. Hydrobiol.*, 15, 1, 43-55.
- ZAHID, W.M. E GANCZARCZYK, J. J. (1994) A technique for a characterisation of RBC biofilm surface. *Wat. Res.* 28:10, 2229-2231.
- ZEHNDER, A.J.B. E STUMM, W. (1988) Geochemistry and biogeochemistry of anaerobic bacteria. *In Biology of Anaerobic Microorganisms*, Alexander J. B. Zenhder (Ed.), John Wiley & Sons, New York, 1-38.
- ZEHNDER, A.J.B., HUSER, B.A., BROCK, T.D. E WUHRMANN, K. (1980) Charaterization of an acetate-decarboxylating, non-hydrogen-oxidizing methane bacterium. *Arch. Microbiol.*, 124, 1-11.
- ZEHNDER, A.J.B., INGVOSEN, K. E MARTI, T. (1982) Microbiology of methane bacteria. *In: Anaerobic Digestion*, Hughes *et al.* (Eds.) p 23-68.
- ZEIKUS, J.G. (1977) The biology of methane bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 41, 514-541.
- ZEIKUS, J.G. (1980) Microbial populations in digesters. *In: Anaerobic Digestion*. D.A. Stafford, B.I. Wheatley and D.E. Hughes (eds.), Applied Science Publishers, London, 61-89.
- ZHANG, T.C. E NOIKE, T. (1994) Influence of retention time on reactor performance and bacterial trophic population in anaerobic digestion processes. *Wat. Res.*, 28, 1, 27-36.
- ZINDER, S.H. (1988). Conversion of acetic acid to methane by thermophiles. *In Proc. 5th Int. Symp. Anaerobic Digestion*, E.R. Hall and P.N. Hobson (Eds), Pergamon Press, New York, 1-12.

- ZINDER, S.H. E KOCH, M. (1984) Non-aceticlastic methanogenesis from acetate: acetate oxidation by a thermophilic syntrophic co-culture. *Arch. Microbiol.*, 138, 263-272.
- ZINDER, S.H., ANGUISH, T. E CARDWELL, S.C. (1984) Selective inhibition by 2-bromoethanesulfonic acid of methanogenesis from acetate in a thermophilic anaerobic digester. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47, 1343-1345.
- ZOETEMEYER, R.J., MATTHIJSSEN, A.J.C.M., COHEN, A. E BOELHOUWER, C. (1982) Product inhibition in the acid forming stage of the anaerobic digestion process. *Wat. Res.*, 16, 633-639.